



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Validación de un método de diagnóstico basado en el ensayo isotérmico mediado por horquillas (LAMP) de *Rickettsia rickettsii* en garrapatas y humanos infectados.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

MVZ Aída Olgúin Barrera

Santiago de Querétaro, Qro, 18 de Diciembre de 2020.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

**Validación de un método de diagnóstico basado en el ensayo isotérmico
mediado por horquillas (LAMP) de *Rickettsia rickettsii* en garrapatas y
humanos infectados**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta:

MVZ Aída Olguín Barrera

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

SINODALES

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito
Presidente

Dr. Luis Tinoco Gracia
Secretario

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú
Vocal

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gamez
Suplente

Dra. Ma. Guadalupe Gordillo Pérez
Suplente

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre, 2020
México

RESUMEN

Rickettsia rickettsii es el agente causal de La Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas. Esta enfermedad es de curso agudo y presenta alta tasa de mortalidad. Se caracteriza por tener signos y síntomas inespecíficos en su etapa inicial, por cual el diagnóstico se dificulta. A la fecha se han desarrollado numerosas técnicas de diagnóstico para esta enfermedad, sin embargo, no son altamente sensibles, ni específicas, ya que generan reacción cruzada con otras enfermedades rickettsiales. La técnica se desarrolló de LAMP para *Rickettsia rickettsii*, la cual ha sido probada en laboratorio y se han estimado sus características analíticas de sensibilidad, especificidad y repetibilidad. La sensibilidad que presenta es de 0.003 ng; la especificidad, se realizó con ADN de 11 especies diferentes de rickettsias, además de *E. canis*, *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum*, así mismo con DNA de humano, de perro y de garrapata *R. sanguineus*, amplificando únicamente la muestra con DNA de *R. rickettsii*. El objetivo del presente trabajo fue validar la técnica de LAMP para *Rickettsia rickettsii* en muestras de campo de garrapatas y humanos infectados, determinando la sensibilidad y la especificidad diagnóstica, además de la reproducibilidad de la técnica. También, se tuvo como objetivo transferirla a laboratorios de diagnóstico en Salud Humana y Salud Animal. Para determinar la especificidad y sensibilidad diagnóstica se obtuvieron un total de 103 muestras: 77 muestras de DNA de sangre de humanos de la Unidad de Investigación de Enfermedades Infecciosas del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS (Ciudad de México); 30 muestras de garrapatas y 26 de sangre de humanos del Instituto de Investigaciones de Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California (Baja California). Posteriormente, las muestras se evaluaron con la técnica de LAMP, la cual fue realizada en los laboratorios de estas dos Instituciones, mediante una prueba en ciego. Se siguió el mismo protocolo, y se realizó con los mismos reactivos y controles, y los resultados obtenidos se compararon con los resultados de la técnica de PCR (prueba de oro). Los resultados obtenidos en las características de rendimiento diagnóstico para las muestras clínicas de humanos fueron una sensibilidad para LAMP colorimétrico con azul de

Hodroxinaftol (HNB) del 93% (IC_{95%} 77.9 – 99.2), una especificidad del 70% (IC_{95%} 58.62 – 80.03) y un k de 0.53 (IC_{95%} 0.35 – 0.70), para electroforesis la sensibilidad fue del 97% (IC_{95%} 82.7 – 99.9) con una especificidad del 58% (IC_{95%} 45.4 - 69) y un k de 0.42 (IC_{95%} 0.26 – 0.58). Para muestras de garrapatas se obtuvo una sensibilidad de 80% (IC_{95%} 51.9 – 95.67), una especificidad de 93% (IC_{95%} 68 – 99.83) para HNB y para electroforesis la sensibilidad y especificidad fue de 87% (IC_{95%} 59.5 – 98.3). El k para ambas fue de 0.73 (IC_{95%} 0.38 - 1). También se estimó la concordancia entre HNB y electroforesis, presentan una muy buena concordancia del 0.82 (IC_{95%} 0.63 – 1) en el caso de humanos y el caso de garrapatas fue de 0.87 (IC_{95%} 0.51 - 1). Se concluye que, la técnica de LAMP para *R. rickettsii* demuestra que es una técnica reproducible en tres regiones distintas del país (Querétaro, Ciudad de México y Baja California) bajo condiciones similares en laboratorios con diferente infraestructura, además, el resultado se obtiene en menor tiempo en comparación con un programa de PCR y se interpreta visualmente mediante cambio de color.

Palabras clave: *Rickettsia rickettsii*, diagnóstico, LAMP, Sensibilidad, especificidad, índice kappa (k).

SUMMARY

Rickettsia rickettsii is the causative agent of Rocky Mountain Spotted Fever. This disease is acute and has a high mortality rate. It is characterized by having nonspecific signs and symptoms in its initial stage, which makes diagnosis difficult. To date, numerous diagnostic techniques have been developed for this disease, however, they are not highly sensitive or specific, since they generate a cross reaction with other rickettsial diseases. The technique was developed from LAMP for *Rickettsia rickettsii*, which has been tested in the laboratory and its analytical characteristics of sensitivity, specificity and repeatability have been estimated. Its sensitivity is 0.003 ng; Specificity was performed with DNA from 11 different species of rickettsiae, in addition to *E. cannis*, *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum*, as well as DNA from human, dog and *R. sanguineus* tick, amplifying only the sample with DNA by *R. rickettsii*. The objective of this work was to validate the LAMP technique for *Rickettsia rickettsii* in field samples of infected ticks and humans, determining the sensitivity and specificity of the diagnosis, as well as the reproducibility of the technique. Also, the objective was to transfer it to diagnostic laboratories in Human Health and Animal Health. To determine the specificity and diagnostic sensitivity, a total of 103 samples were obtained: 77 DNA samples from human blood from the Infectious Diseases Research Unit of the Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS (Mexico City); 30 tick and 26 human blood samples from the Veterinary Sciences Research Institute of the Autonomous University of Baja California (Baja California). Subsequently, the samples were evaluated with the LAMP technique, which was performed in the laboratories of these two Institutions, by means of a blind test. The same protocol was followed, and it was performed with the same reagents and controls, and the results obtained were compared with the results of the PCR technique (gold test). The results obtained in the diagnostic performance characteristics for the human clinical samples were a sensitivity for colorimetric LAMP with Hydroxynaphthol blue (HNB) of 93% (CI 95% 77.9 - 99.2), a specificity of 70% (CI 95% 58.62 - 80.03) and a k of 0.53 (95% CI 0.35 - 0.70), for electrophoresis

the sensitivity was 97% (95% CI 82.7 - 99.9) with a specificity of 58% (95% CI 45.4 - 69) and a k of 0.42 (95% CI 0.26 - 0.58). For tick samples a sensitivity of 80% (95% CI 51.9 - 95.67) was obtained, a specificity of 93% (95% CI 68 - 99.83) for HNB and for electrophoresis the sensitivity and specificity was 87% (95% CI 59.5 - 98.3). The k for both was 0.73 (95% CI 0.38 - 1). The concordance between HNB and electrophoresis was also estimated, they present a very good concordance of 0.82 (95% CI 0.63 - 1) in the case of humans and the case of ticks was 0.87 (95% CI 0.51 - 1). It is concluded that the LAMP technique for *R. rickettsii* shows that it is a reproducible technique in three different regions of the country (Queretaro, Mexico City and Baja California) under similar conditions in laboratories with different infrastructure, in addition, the result is obtained in less time compared to a PCR program and is visually interpreted by color change.

Key words: *Rickettsia rickettsii*, diagnosis, LAMP, Sensitivity, specificity, kappa index (k).

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico primero que nada a mis padres y hermanos, que siempre me han dado la confianza, la libertad y la oportunidad de hacer cuanto he querido y sobre todo que me dan su cariño a diario. ¡Gracias!

Principalmente te la dedico a ti Gonzo, tú que siempre has estado ahí en todo momento, que me has dado más de lo que merezco y muchas veces a pesar de que las circunstancias no lo permitían nunca me negaste nada y nunca me lo has negado. Has sido nuestra fortaleza para seguir adelante. Te quiero mucho hermano.

A Abdías que siempre me motiva por ser siempre algo más en la vida. Y que nos dio una gran bendición, mi sobrina Yalina. Gracias, los quiero mucho.

A todos mis amigos que he ido conociendo a lo largo de mi vida y que ya forman parte de mi familia, que por una extraña razón me quieren y confían en mí.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a la vida por permitir levantarme día a día y hacer todo cuanto deseo.

Al Dr. Juan Mosqueda por confiar en mí para trabajar con él y darme la oportunidad de vivir esta experiencia. Sobre todo, le agradezco por motivarme. En verdad se lo agradezco bastante, fue un gran honor pertenecer a su equipo de trabajo, aprendí muchísimo de cada uno.

A la Universidad Autónoma de Querétaro que me aceptó y que me brindó una beca para estudiar la Maestría. A todos los profesores que me dieron clases durante este período, gracias, aprendí mucho de ustedes.

A la Maestría SPAS y a sus Coordinadoras. Dra. Araceli Aguilera Barreiro gracias por ser una guía en el proceso, estar siempre pendiente de cada uno de nosotros, por ayudarnos a realizar cada trámite y no permitir que se nos fueran las fechas, gracias por tenernos tan consentidos. Dra. Gabriela Aguilar, gracias por seguir como nuestra guía, por esa gran disposición para apoyarnos y a pesar de que no sabía muchas de nuestras dudas, nunca nos dijo no, siempre hacía lo imposible por resolverlas.

Al CONACYT, por la oportunidad de ser acreedora a una beca para seguir formándome como profesionista, y no solo como profesionista sino también personalmente.

A mis asesores de tesis. Dra. Bertha Carvajal gracias por confiarme su técnica para trabajar con ella en mi proyecto de tesis y su disposición para enseñarme; Dra. Gabriela Aguilar gracias por estar siempre disponible y apoyarme

incondicionalmente; Dra. Guadalupe Gordillo, le agradezco infinitamente la oportunidad de poder trabajar con usted en su laboratorio y sobre todo la confianza que me dio al darme sus muestras para yo poder realizar los objetivos planteados en mi tesis, y por último y no menos importante, Dr. Luis Tinoco, también le agradezco infinitamente al recibirme en su Laboratorio, y confiar en mí para poder trabajar en él y con sus muestras, agradezco su gran gesto de confianza.

A la Unidad de Investigación de Enfermedades Infecciosas del Centro Médico Nacional Siglo XXI de la Ciudad de México (UIMEIP-CMNSXXI) y al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California (IICV-UABC), que me permitieron realizar mis estancias para cumplir con mi programa de Maestría y objetivos de mi tesis. Gracias por su apoyo y oportunidad de estar ahí. Fue una gran experiencia.

A mis compañeros de la Maestría y a mis compañeros del Laboratorio de Inmunología y Vacunas. Gracias por todos esos momentos, tanto buenos como malos, fue un placer compartirlos.

ÍNDICE	Página
RESUMEN	i
SUMMARY	iii
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE Página.....	viii
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas	3
2.1.1 Historia	3
2.1.2 Etiología	5
2.1.3 Vector.....	7
2.1.4 Distribución geográfica	10
2.1.5 Ciclo de vida de la garrapata	12
2.1.6 Patogenia	14
2.1.7 Signos clínicos y lesiones	16
2.1.8 Tratamiento.....	17
2.1.9 FMMR en perros	19
2.1.10 Diagnóstico	20
2.1.10.1 Métodos Serológicos.....	20
2.1.10.2 Métodos inmunohistológicos.....	23
2.1.10.3 Métodos Moleculares	24
2.1.10.4 Cultivo Celular	25
2.2 Amplificación isotérmica basada en horquillas LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)	27
2.2.1 Fundamento	28
2.2.2. Análisis del producto amplificado de la reacción LAMP	32

2.2.2.1. Interpretación visual utilizando azul de hidroxinaftol	33
2.3 Validación de un método de diagnóstico	34
2.3.1. Etapa de Desarrollo	35
2.3.2. Etapa de Validación	36
2.3.2.1. Fase 1: Características analíticas del método	36
2.3.2.2. Fase 2: Características diagnósticas del método.....	37
2.3.2.3. Fase 3: Reproducibilidad del método.....	42
2.3.2.4. Fase 4: Implementación del método	43
III. JUSTIFICACIÓN	44
IV. HIPÓTESIS	45
V. OBJETIVOS	45
5.1 Objetivo general	45
5.2 Objetivos específicos	45
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	46
6.1 Estandarización de la reacción de LAMP	46
6.2 Preparación de alícuotas de la reacción de LAMP	46
6.3 Obtención de las muestras	47
6.4 Evaluación de las muestras con el método LAMP.....	47
6.5 Determinación de Especificidad y Sensibilidad diagnóstica.....	48
6.6 Evaluación de la reproducibilidad	48
6.7 Transferencia de tecnología.....	49
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
7.1 Estandarización del método de LAMP y preparación de las alícuotas de la reacción	50
7.2 Determinación de los indicadores de diagnóstico del método de LAMP.....	52
7.3 Características operativas de la validación del método de LAMP	59
VIII. CONCLUSIONES.....	62
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación taxonómica de <i>R. rickettsii</i> .	6
2	Clasificación taxonómica de las garrapatas vectores de <i>R. rickettsii</i> .	7
3	Características principales de los diferentes métodos de diagnóstico para <i>R. rickettsii</i> .	26
4	Tamaño de muestras para estimar la sensibilidad y especificidad diagnóstica, de acuerdo al error permitido y nivel de confianza.	38
5	Estimación de sensibilidad y especificidad diagnóstica en una tabla 2x2.	39
6	Grado de concordancia en función del índice Kappa.	41
7	Interpretación general de los valores absolutos de las razones de verosimilitud positiva y negativa.	42
8	Resultados obtenidos por la técnica de LAMP y PCR en muestras clínicas de humanos y garrapatas y su nivel de concordancia.	54
9	Indicadores de desempeño diagnóstico del método de LAMP para muestras clínicas de humanos.	56
10	Indicadores de diagnóstico del método de LAMP para muestras de garrapatas.	57
11	Cálculo del costo por reacción del método de LAMP para <i>R. rickettsii</i> .	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Organización filogenética en cuatro grupos (grupo typhus (TG), grupo fiebre manchada (SFG), grupo <i>Rickettsia belli</i> y grupo <i>Rickettsia canadensis</i>) de las especies de <i>Rickettsia</i> basada en la secuencia de su genoma.	5
2	Hembras adultas: <i>Dermacentor variabilis</i> , (A); <i>Dermacentor andersoni</i> (B); <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (C); <i>Amblyomma cajennense</i> (D).	9
3	Distribución geográfica de los vectores de <i>R. rickettsii</i> en el continente americano.	11
4	Distribución de casos de <i>Rickettsia rickettsii</i> en México a principios de 1940 (puntos de color azul rey), casos reportados en los últimos años (puntos de color rojo), y <i>Rickettsia rickettsii</i> detectada en garrapatas (puntos de color azul claro).	12
5	Ciclos biológicos de las garrapatas: <i>Dermacentor variabilis</i> , <i>Dermacentor andersoni</i> ; <i>Rhipicephalus sanguineus</i> ; y <i>Amblyomma cajennense</i> .	13
6	Mecanismo de invasión de <i>R. rickettsii</i> a células endoteliales del hospedero.	15
7	Regiones del ADN blanco (imagen de arriba), dos cebadores internos (imagen de abajo, izquierda) y dos cebadores externos (imagen de abajo, derecha) utilizados en el método LAMP.	28
8	Reacción LAMP. Se muestran los tres pasos de la reacción: Formación del la horquilla, ciclo de amplificación, y elongación.	29
9	Reacción LAMP con uso de oligonucleótidos Loop.	31
10	Detección visual de la reacción, comparando la sensibilidad usando diluciones seriadas de DNA.	33
11	Proceso de validación de una prueba de diagnóstico.	34

12	Reacción de LAMP para <i>Rickettsia rickettsii</i> .	50
13	Evaluación de las alícuotas para la reacción de LAMP.	51
14	Reacción de LAMP con muestras de campo del laboratorio de la UIMEIP-CMNSXXI.	53
15	Repetibilidad de resultados de la reacción de LAMP en el laboratorio de la UIMEIP-CMNSXXI.	53

I. INTRODUCCIÓN

La Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR) es una enfermedad infecciosa que presenta una alta tasa de mortalidad en personas y animales infectados. Es causada por la bacteria *Rickettsia rickettsii* que es transmitida por garrapatas de la familia Ixodidae (Wilson & Chowning, 1904; Walker, 1989; Parola & Raoult, 2001). Esta enfermedad es de curso agudo y presenta una variedad de signos, síntomas y lesiones clínicas inespecíficas, como fiebre y lesiones máculo-papulares en piel, las cuales se llegan a observar en el 10 % de la población infectada. Las manifestaciones severas y tardías se caracterizan por un daño vascular sistémico. Por lo tanto, si no se trata a tiempo, se pueden producir lesiones graves que progresan a una falla multiorgánica y la muerte del individuo (Biggs *et al.*, 2016).

Los casos fatales de FMMR es porque la mayoría de éstos en una primera instancia se confunden con otras enfermedades por sus manifestaciones clínicas inespecíficas, principalmente enfermedades rickettsiales, lo cual dificulta un diagnóstico clínico certero y el tratamiento adecuado en la etapa temprana de la enfermedad, donde es crucial (Thorner *et al.*, 1998). A la fecha, se han desarrollado numerosos métodos para el diagnóstico de esta enfermedad, que incluyen métodos serológicos, inmunohistológicos, aislamiento en cultivos, amplificación por PCR de ADN de la bacteria, entre otros. Sin embargo, cada uno de estos métodos varía en disponibilidad, tiempo para obtener resultados, características de rendimiento, costos, así como especificidad y sensibilidad (La Scola & Raoult, 1997). La mayoría de los métodos serológicos son poco útiles al inicio de la enfermedad o fase aguda y en pacientes convalecientes, porque los anticuerpos son detectables de 7-10 días después del inicio de los síntomas, además, generan una reacción cruzada con otras bacterias del mismo género y los índices de sensibilidad son bajos (Kaplan & Schonberger, 1986; Thorner *et al.*, 1998).

LAMP es un método que amplifica ácidos nucleicos en condiciones isotérmicas, con alta sensibilidad y especificidad, desarrollado por Notomi *et al.*, en el año 2000. LAMP se basa en la síntesis de ADN de desplazamiento de cadena de autociclo, que se lleva a cabo mediante una enzima con alta actividad de helicasa (ADN Polimerasa *Bst* de *Bacillus stearothermophilus*) y un conjunto de cuatro oligonucleótidos: dos internos (FIP y BIP) y dos externos (B3 y F3) que reconocen seis regiones separadas dentro de una secuencia de ADN blanco (Notomi *et al.*, 2000).

La eficiencia de amplificación del método LAMP es extremadamente alta (10^9 copias de DNA blanco en menos de una hora). Además, este método sintetiza 10-20 μg de ADN específico para una mezcla de reacción de 25 μl en 30–60 minutos (Mori *et al.*, 2001). Para el análisis del producto amplificado la técnica más utilizada es la electroforesis en gel agarosa al 1.5 % (Notomi *et al.*, 2000). Sin embargo, se han desarrollado otros métodos que permiten la observación visual y la cuantificación de los resultados con mayor rapidez. Uno de estos métodos de detección visual es el uso del azul de hidroxinaftol (HNB), que es un indicador de ión metálico donde el cambio de color indica una reacción positiva de violeta del HNB a azul cielo (Goto *et al.*, 2009).

Por todo lo anterior, LAMP presenta características que valida un método de diagnóstico. Y puede ser utilizado en la etapa aguda de RMFS, donde de la precisión y velocidad del diagnóstico son cruciales para la toma de decisiones. El objetivo de este trabajo fue validar la prueba de LAMP de *Rickettsia rickettsii* en garrapatas y humanos infectados.

II. ANTECEDENTES

2.1 Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas

La Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas), es una enfermedad infecciosa de curso agudo, febril, que presenta una alta tasa de mortalidad en personas y animales infectados. Es causada por la bacteria *Rickettsia rickettsii*, transmitida por garrapatas de la familia Ixodidae. Esta enfermedad se distribuye principalmente en el hemisferio occidental y se caracteriza por ser estacional, principalmente de los meses de abril a septiembre (Wilson & Chowning, 1904; Walker, 1989; Parola & Raoult, 2001).

El nombre de esta enfermedad ésta asociada a la localización geográfica donde se encuentra, a los síntomas (principalmente fiebre) y lesiones que produce en la piel (manchas). Sin embargo, en Brasil se le conoce como “fiebre manchada brasileña” y en Colombia como “fiebre de Tobia” (Biggs *et al.*, 2016).

2.1.1 Historia

El primer caso atribuido a la enfermedad de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas, fue en el Valle Bitter Root del Oeste de Montana en 1873 (Walker, 1989). En 1896, Wood realiza una descripción del curso clínico de la “fiebre manchada”, considerada como una enfermedad de causa desconocida, y que la fuente del virus estaba al aire libre, restringida principalmente a los meses de primavera y sugiere el nombre de "Exantesis Rosalia Artrodinia" (Wolbach, 1919).

Maxey E.E. en 1899, publicó la primera descripción clínica de la Rickettsiosis, y la define como una enfermedad de curso agudo, endémica, no contagiosa y probablemente infecciosa. La distribución geográfica, la época de presentación (primavera), la incidencia y la mortalidad fueron relacionadas con la edad y el sexo de las personas; así como los signos, síntomas y lesiones patológicas. En algunas muestras de frotis sanguíneos observaron estructuras

ovoides dentro de los eritrocitos y determinaron que el agente causal de la fiebre manchada era un parásito protozooario intraeritrocítico, similar a *Piroplasma* y le dieron el nombre de *Piroplasma hominis* (Wilson y Chowning, 1904). Sin embargo, mediante microscopía de luz y con una técnica modificada de la tinción de Giemsa, se visualizó por primera vez y de manera convincente, al agente etiológico y se demostró su presencia en los óvulos y en las diferentes etapas de desarrollo de las garrapatas (Wolbach, 1919), donde la garrapata se puede infectar en una etapa y transmitirla a las etapas siguientes (Ricketts, 1909).

Posteriormente en 1903, Anderson señaló que esta fiebre era restringida a los Estados de las Montañas Rocosas, acuñando el término para la enfermedad (Anderson, 1903. Citado por Wolbach, 1919). Por otro lado, el término *Rickettsia* se acepta universalmente como nombre genérico de estos organismos causantes de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas y se convierte en *Rickettsia rickettsii*, término propuesto por Brumpt en 1922, donde la designación fue totalmente válida (Brumpt, 1922 citado por Benotson, 1947).

En México, la RMSF transmitida por garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* fue reconocida inicialmente durante la década de 1940, donde epidemiólogos del Instituto de Salud y Enfermedades Tropicales de la Ciudad de México, Bustamante y Varela, 1943, presentaron los primeros hallazgos clínicos, epidemiológicos y entomológicos sobre esta enfermedad en zonas rurales de los municipios de El Fuerte y Choix en Sinaloa, y Álamos en Sonora. Estos datos revelan más de 200 casos en los cuales la semiología, las lesiones encontradas, y la edad en los pacientes, así como, la época del año, eran características de la enfermedad, los cuales fueron confirmados con apoyo del Laboratorio Rocky Mountain en Hamilton, MT, EE. UU (Bustamante y Varela, 1943).

2.1.2 Etiología

Rickettsia rickettsii es el agente causal de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas. Se ha clasificado filogenéticamente en el grupo de Fiebre manchada del género *Rickettsia*, que presenta dos grupos más (Figura 1) (Merhej *et al.*, 2009). Esta clasificación se estableció, en un principio, de acuerdo con las características morfológicas, antigénicas y metabólicas que poseen sus miembros. Sin embargo, las nuevas técnicas de identificación, principalmente los métodos moleculares, permitieron conocer las relaciones filogenéticas que existen entre las especies de este género de manera confiable, como el uso de secuencias del gen 16S *rRNA*, que constituyó un avance importante en su estudio y clasificación (Stothard y Fuerst, 1995), así como las secuencias de los genes de la familia de proteínas transportadores presentes en la membrana externa de la bacteria: *ompA*, *ompB*, *sca4*, *sca1*, *sca2*, y el gen *gltA* (Philip *et al.*, 1978; Weisburg *et al.*, 1989; Fournier *et al.*, 1998; Roux y Raoult, 2000; Fournier y Raoult, 2009).

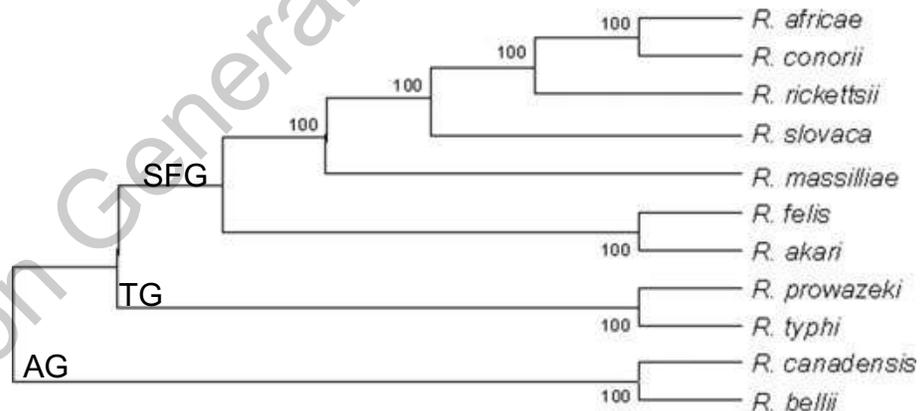


Figura 1. Organización filogenética en tres grupos: Grupo Typhus (TG), grupo fiebre manchada (SFG), grupo ancestral (AG) de las especies de *Rickettsia* basada en la secuencia de su genoma (Fournier & Raoult, 2009).

Por lo tanto, estos datos también ayudaron a la clasificación taxonómica de *Rickettsia rickettsii* (cuadro 1). *Rickettsia rickettsii* es una bacteria de forma cocobacilar pleomórfica, intracelular obligada, de tamaño pequeño (0.20-0.50 a 0.3-2.0 μm), Gram negativa porque se tiñe con fucsina básica utilizando el método de Giménez (1964), su pared celular contiene lipopolisacáridos, peptidoglicanos, además de una proteína principal de 135 kDa (OmpB), una lipoproteína de 17 kDa y una proteína OmpA expuesta en la superficie compuesta por diferentes números de unidades de repetición en tándem casi idénticas (Walker y Bouyer, 2015).

Crece en asociación con células eucariotas que requieren para replicarse, se dividen por fisión binaria en el citoplasma y pueden causar enfermedades en los hospederos de invertebrados (que actúan como vectores y reservorios) u hospederos de vertebrados (Wolbach, 1919). De manera natural infecta a células del endotelio vascular y para su cultivo en el laboratorio necesita el uso de células vivas del hospedero (modelos animales y/o huevos embrionados) o cultivos celulares (Vero, L929, pulmón embrionario humano, Células MRC5) (Raoult y Roux, 1997; Dantas-Torres, 2007).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *R. rickettsii*

Reino: Bacteria
Filo: Proteobacteria
Clase: Alphaproteobacteria
Orden: Rickettsiales
Familia: <i>Rickettsiaceae</i>
Género: <i>Rickettsia</i>
Especie: <i>Rickettsia rickettsii</i>

(Dantas-Torres, 2007).

2.1.3 Vector

Las garrapatas son artrópodos con implicaciones en Salud Pública y Veterinaria. Son parásitos que se alimentan de sangre de una gran diversidad de vertebrados (mamíferos, aves y/o reptiles), siendo los mamíferos los principales hospede. También, son parásitos que pueden actuar como vectores y/o reservorios de agentes patógenos como virus, bacterias y protozoarios. Asimismo, tienen la capacidad de mantener un agente patógeno en la naturaleza a través de varias generaciones mediante dos vías: por vía transovárica (de la hembra a su progenie), o interestadial (de larva a ninfa y de ninfa a adulta), afectando animales, tanto silvestres como domésticos, y a los humanos (Oliver, 1989).

Las garrapatas de la familia Ixodidae o garrapatas duras, llamadas así debido a la placa esclerotizada que presentan dorsalmente (escudo); las cuales en su mayoría pertenecen a los géneros *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Ixodes* y *Haemaphysalis* (Oliver, 1989). Sin embargo, las especies de garrapatas de nuestro interés que se encuentran implicadas en la transmisión de la bacteria *R. rickettsii* son: *Dermacentor variabilis*, *Dermacentor andersoni*, *Rhipicephalus sanguineus*, y *Amblyomma mixtum*, *A. imitator* y *A. aureolatum* (cuadro 2) (Thorner et al., 1998, Dantas-Torres, 2008).

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de las garrapatas vectores de *R. rickettsii*

Filo	Arthropoda		
Clase	Arachnida		
Orden	Acarina		
Suborden	Ixodoidea		
Familia	Ixodidae		
Género	<i>Rhipicephalus</i>	<i>Amblyomma</i>	<i>Dermacentor</i>
Especie	<i>sanguineus</i>	<i>imitator, mixtum, aureolatum</i>	<i>variabilis, andersoni</i>

(Dantas-Torres, 2008)

Las especies de garrapata del género *Dermacentor* como: *Dermacentor variabilis* (figura 2A), conocida como la garrapata americana del perro y *Dermacentor andersoni* (figura 2B), que es la garrapata del bosque, tienen como

principales hospedero a los ciervos, los perros y el ganado bovino. Las garrapatas adultas tienden a alimentarse de sangre de humanos, pero no es común que lo hagan sus estadios larvales y ninfales. Se encuentran principalmente en áreas boscosas, arbustivas, senderos y caminos (Dantas-Torres, 2008; Biggs *et al.*, 2016).

La garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (figura 2C), es conocida como la garrapata marrón del perro. Habitualmente se encuentra en los caninos, especialmente en los perros domésticos, donde presentan todos sus estadios; también, se llegan a encontrar en otros animales y en el humano (Dantas-Torres, 2008), el cual llega a ser huésped accidental, por su estrecho contacto con perros que se encuentran infestados de garrapatas o ambientes infestados de éstas y también se debe a que es la única garrapata capaz de establecerse y colonizar las casas de los humanos (Yoder, 2006). Todos sus estadios (larvas, ninfas y adultos) pueden transmitir *R. rickettsii* a humanos y a perros (Biggs *et al.*, 2016).

Amblyomma mixtum (figura 2D) afecta principalmente a ungulados domésticos (burros, caballos, mulas), así como, mamíferos grandes, tanto silvestres como domésticos, y en ocasiones a humanos en su etapa adulta. Las etapas inmaduras (larvas y ninfas) pueden alimentarse de un gran número de vertebrados, incluidos los marsupiales, los mamíferos grandes y pequeños, los humanos y en ocasiones las aves (Cooley & Kohls, 1944; Beati *et al.*, 2013). Esta garrapata se ha adaptado a ecosistemas tan diferentes como los pastizales semiáridos y los bosques secundarios subtropicales (Beati *et al.*, 2013).

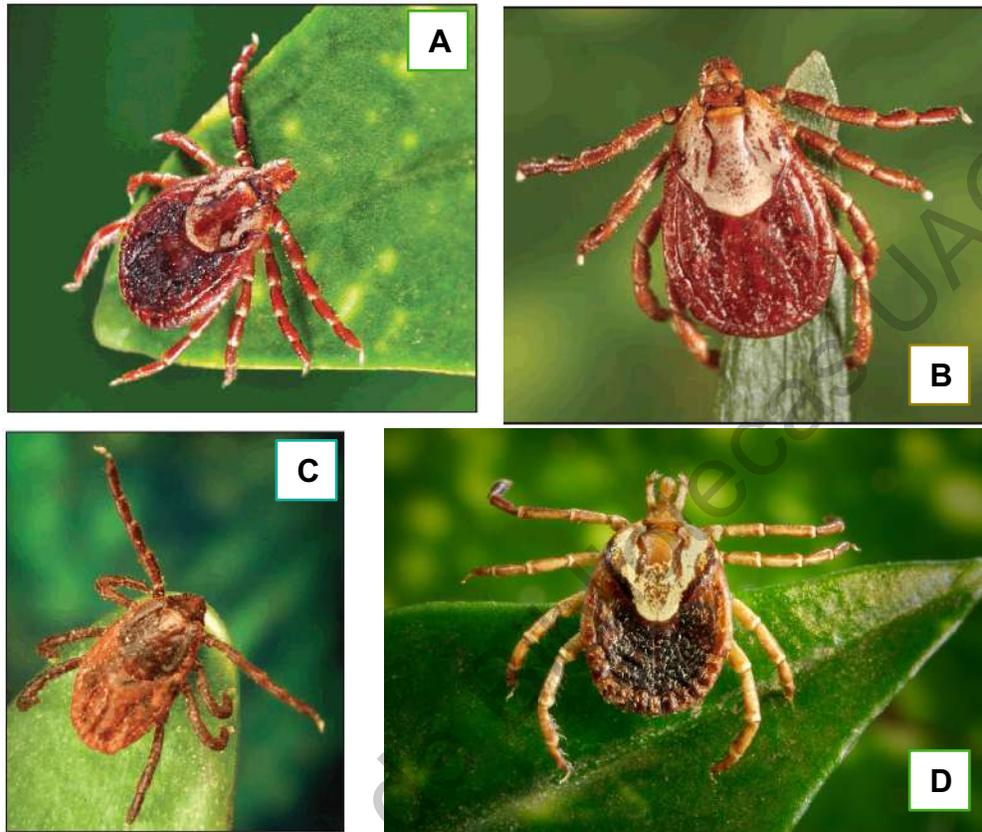


Figura 2. Hembras adultas: *Dermacentor variabilis*, (A); *Dermacentor andersoni* (B); *Rhipicephalus sanguineus* (C); *Amblyomma mixtum* (D) (imágenes tomadas de CDC, 2016).

El centro de control y prevención de enfermedades (CDC) de Estados Unidos de América, en un informe del año 2016, menciona que varias especies de garrapatas del género *Amblyomma* son vectores de *R. rickettsii* y que se distribuyen desde México hasta Argentina. Estas especies incluyen *A. aureolatum* (comúnmente conocida en Brasil como la garrapata amarilla del perro), *A. imitator* (se demostró la presencia de *R. rickettsii* en los huevos de las garrapatas) (Oliveira, et al., 2010) y *A. mixtum* (Biggs et al., 2016).

2.1.4 Distribución geográfica

R. rickettsii se encuentra distribuida geográficamente en el continente americano y su presentación se debe a varios factores como sus vectores, sus hospederos, y a las condiciones óptimas para su desarrollo, las cuales son importantes porque aun cuando estén las garrapatas no quiere decir que la enfermedad esta presente en la zona (Parola *et al.*, 2005).

Sin embargo, refleja la distribución de sus vectores (figura 3). *D. variabilis* está presente en dos terceras partes del este de los Estados Unidos, en el centro y en algunas zonas de la costa oeste; *D. andersoni* se encuentra en los estados del oeste de Estados Unidos en la zona de las Montañas Rocosas y en la parte suroeste de Canadá; *Rhipicephalus sanguineus* está presente en México y actualmente se encuentra relacionada con algunos casos de *R. rickettsii* en Arizona (Demma *et al.*, 2005), lo que implica que es capaz de sobrevivir en una amplia gama de ecosistemas (Parola *et al.*, 2005; Yoda, 2006).

El género *Amblyomma* tiene una amplia distribución ya que se encuentra desde el sur de Texas hasta el norte de Argentina. En México están presentes *A. imitator* y *A. mixtum* (Oliveira, *et al.*, 2010; Biggs *et al.*, 2016). En países de América Central y América del Sur está *A. aureolatum*, así como en el Caribe, a lo largo de la costa Atlántica (Brasil, Guatemala, Nicaragua, Costa Rica, Colombia, Guayana, Panamá, Honduras, Cuba, Trinidad, Venezuela, Paraguay y Argentina) (Cooley & Kohls, 1944; Thorner *et al.*, 1998; Parola *et al.*, 2005).

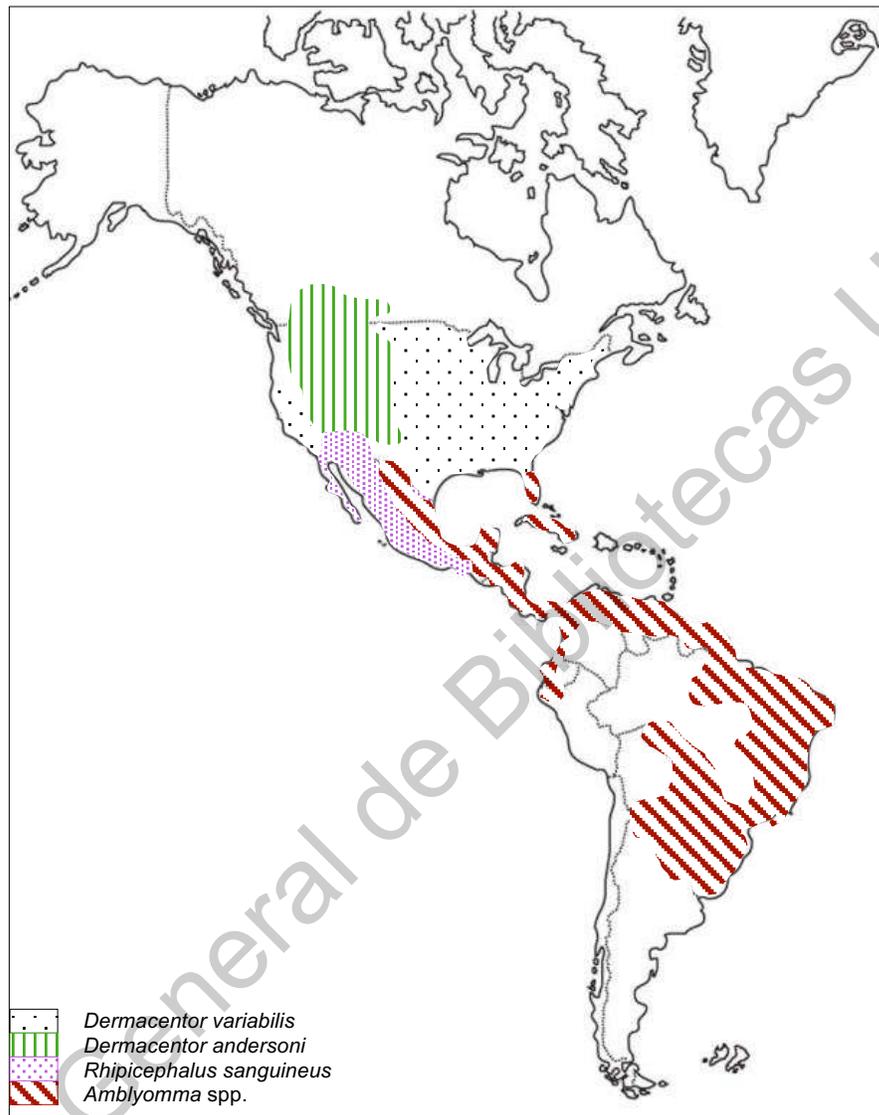


Figura 3. Distribución geográfica de los vectores de *R. rickettsii* en el continente americano (Olguín, 2018).

En México, la distribución de la enfermedad se ha establecido de acuerdo con los casos registrados, los cuales, datan de principios de la década de 1940 en varios estados del norte y centro de ese país, incluyendo Coahuila, Durango, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora y Veracruz (Bustamante & Varela, 1943; Parola *et al.*, 2005). Actualmente, ya se han registrado nuevos casos en los Estados de Baja California (Eremeeva, *et al.*, 2011; Tinoco-Gracia *et al.*, 2018), Yucatán (Zavala-

Castro *et al.*, 2006), Nuevo León (Oliveira, *et al.*, 2010), Sinaloa y Sonora (figura 4) (Álvarez-Hernández *et al.*, 2017).



Figura 4. Distribución de casos de *R. rickettsii* en México a principios de 1940 (puntos de color azul rey), casos reportados en los últimos años (puntos de color rojo), y *R. rickettsii* detectada en garrapatas (puntos de color azul claro) (Álvarez-Hernández *et al.*, 2017).

2.1.5 Ciclo de vida de la garrapata

La disponibilidad del huésped y las características del hábitat son factores importantes en los ciclos de vida de las garrapatas. En la naturaleza, los períodos de muda y alimentación pueden variar ampliamente entre poblaciones, ya que están directamente influenciados por la temperatura. Asimismo, puede variar en cada microrregión (Nuttall, 1915; Oliver, 1989).

El ciclo de vida de *Dermacentor variabilis*, *Dermacentor andersoni*, *Rhipicephalus sanguineus*, y *Amblyomma* spp. (figura 5), se basa en el mismo principio: todas géneros requieren de tres hospederos para completar su ciclo, uno para cada etapa de desarrollo: larva, ninfa y adulto (Nuttall, 1915; Oliveira *et al.*, 2000).

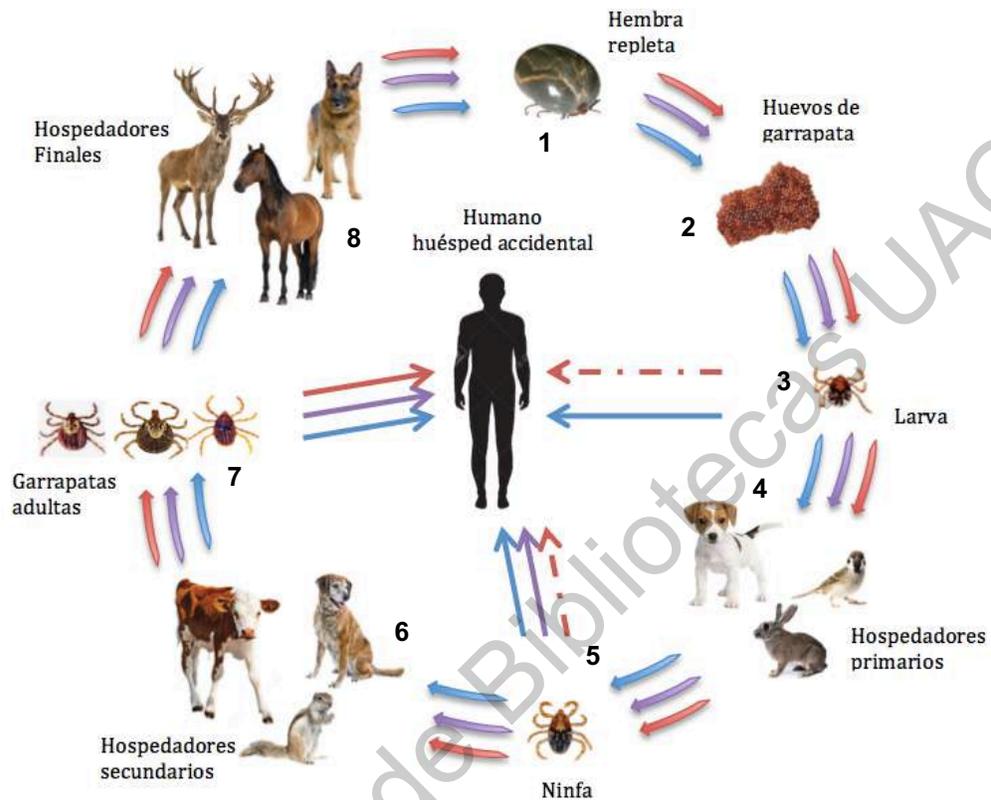


Figura 5. Ciclos biológicos de las garrapatas: *Dermacentor variabilis*, *Dermacentor andersoni* (flechas de color rojo); *Rhipicephalus sanguineus* (flechas de color azul); y *Amblyomma* spp. (flechas de color morado). Las garrapatas adultas copulan arriba del hospedero y se alimentan de éste. Las hembras una vez que copularon y se encuentran repletas [1], se dejan caer del hospedero y ovipositan en un lugar protegido (suelo, grietas, hendiduras, pastos, maleza) y posteriormente mueren [2]. Los huevos eclosionan a larvas [3] y éstas buscan un hospedero para alimentarse [4], entonces caen del hospedero para poder mudar a ninfa [5], las ninfas buscan un hospedero y se alimentan de él por un período de tiempo [6], después se dejan caer para poder mudar a adultos [7]. Las garrapatas adultas también buscan un hospedero, donde copulan y se alimentan continuando nuevamente con el ciclo [8] (Nuttall, 1915; Oliveira *et al.*, 2000).

Sin embargo, hay algunas diferencias entre géneros. El ciclo de vida de *Rhipicephalus sanguineus* en condiciones favorables, puede completarse de 63 a 91 días (Nuttall, 1915; Dantas-Torres, 2008). *Amblyomma* spp. en condiciones

naturales, produce una generación por año y en condiciones de laboratorio puede completar hasta dos generaciones por año. En estudios realizados en Sudamérica, encontraron que la presencia de larvas predomina en los meses de abril a julio (otoño), las ninfas de junio a octubre (invierno) y los adultos de octubre a marzo (primavera-verano) (Oliveira *et al.*, 2000; Labruna *et al.*, 2002; 2003). El estadio larval de *Dermacentor variabilis*, en Norteamérica, se observa en los meses de mayo y principios de junio, mientras que las ninfas son más activas a finales de junio y principios de julio. Las ninfas se transforman en adultos durante el verano tardío, resultando que una generación demore un año en Estados Unidos y 2 años en Canadá. Esto se debe a que las larvas que nacen de los huevos entran en diapausa (latencia) por un período determinado de tiempo hasta que encuentran las condiciones favorables para que se alimenten y muden al siguiente estadio (ninfa) (Anderson & Magnarelli, 2008).

2.1.6 Patogenia

Como ya se ha mencionado *R. rickettsii* es un patógeno intracelular, por lo cual necesita mecanismos o factores de patogenicidad para poder invadir células huésped (figura 6). Algunos factores son: las adhesinas que se encuentran en la membrana de la bacteria, receptores de la célula del hospedero, elementos de señalización asociados a la fagocitosis inducida para la entrada de la bacteria a la célula blanco, enzimas rickettsiales que median el escape del fagosoma y actina del huésped la cual ayuda a la invasión a otra célula blanco (Walker, 2007).

Las rickettsias se multiplican dentro de las células endoteliales de los vasos sanguíneos, y producen una lesión vascular generalizada, resultando en la activación de factores de coagulación, extravasación de líquido y reducción de la perfusión del tejido. Una manifestación importante de la lesión de células endoteliales es el aumento de la permeabilidad vascular, que conduce a edema, hipovolemia, hipotensión e hipoalbuminemia (Thorner *et al.*, 1998).

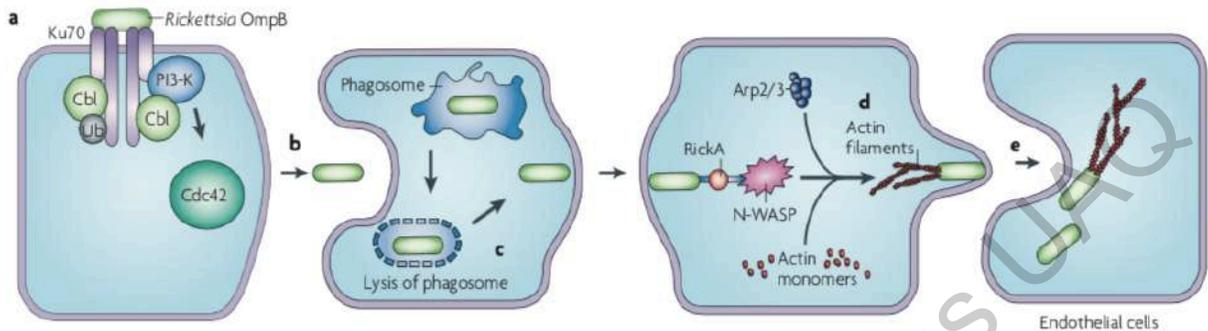


Figura 6. Mecanismo de invasión de *R. rickettsii* a células endoteliales del huésped. Las rickettsias son inoculadas a través de la piel mediante la mordedura de la garrapata y diseminadas por vasos linfáticos y sanguíneos. Éstas entran al endotelio vascular y a las células del músculo liso vascular mediante la adhesión de las proteínas de superficie de la bacteria (*OmpB* y *OmpA*), con el receptor de la célula hospedero (Ku70). La adhesión de *OmpB* y *OmpA* con Ku70 aumenta el número de moléculas Ku70 en la membrana celular, donde se producen nuevas uniones con *OmpB* y *OmpA* [a]. Posteriormente las ubiquitinaciones de Ku70 por ubiquitinas ligasa Cbl (enzima que marca a proteínas que van a ser degradadas), y los eventos de transducción de señales que involucran Cdc42 (una pequeña guanidina trifosfatasa), la proteína tirosina quinasa, la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3-K) y quinasas de la familia Src activan el complejo Arp 2/3 (proteínas relacionadas con la actina), para inducir la actina citoesquelética y dar lugar a la fagocitosis de la rickettsia adherida [b]. Las rickettsias para ingresar al citosol de la célula huésped en donde los nutrientes están disponibles para su crecimiento, y para evitar ser degradadas en el fagosoma, deben escapar de éste, por lo que secretan fosfolipasa D y hemolisina C, que rompen la membrana del fagosoma [c]. RickA, es otra proteína de las rickettsias, expresada en su superficie, que recluta a N-WASP (proteína del Síndrome de Wiskott-Aldrich), que a su vez estimula al complejo Arp 2/3, el cual inicia la polimerización de la actina de la célula huésped. Los filamentos de actina mueven a las rickettsias a través del citosol hacia la superficie de la célula del hospedero, donde la membrana de la célula del hospedero se deforma hacia afuera y se invagina en la célula adyacente [d]. La interrupción de ambas membranas celulares permite que la rickettsia entre a la célula adyacente sin estar expuesta al ambiente extracelular [e]. Algunas rickettsias salen a través de la superficie luminal de los vasos sanguíneos hacia el torrente sanguíneo (Walker, 2007; Walker & Ismail, 2008).

2.1.7 Signos clínicos y lesiones

La FMMR puede presentar una variedad de signos, síntomas y lesiones clínicas inespecíficas. El período de incubación es de 3 - 12 días, con promedio de 7 días, después de la mordedura de garrapata (Wolbach, 1919). El inicio de la enfermedad se caracteriza por fiebre moderadamente alta (generalmente mayor a 38.9 °C) y dolor de cabeza, que pueden estar asociados con malestar general, mialgias, principalmente en los músculos abdominales, de la espalda y de los muslos, seguidos por trastornos digestivos inespecíficos, como náuseas, vómito, anorexia, dolor abdominal generalizado o focal y diarrea (Wolbach, 1919; Walker, 1995).

Las erupciones en la piel generalmente aparecen de 3 - 5 días después de la fiebre y comienzan como pequeñas máculas irregulares y rosadas que generalmente aparecen primero en muñecas, tobillos y antebrazos, pero se propaga rápidamente a todas las partes del cuerpo. Las erupciones puede evolucionar más tarde a pápulas o petequias. El daño continuo en la piel y en los tejidos causado por *R. rickettsii* puede provocar necrosis de la piel y gangrena de los dedos de las manos, los pies, las orejas y los genitales externos. Aproximadamente en el 10% de los pacientes, la erupción puede estar ausente, lo que puede retrasar el diagnóstico y la terapia (Wolbach, 1919; Hattwick *et al.*, 1978; Parola *et al.*, 1997).

Las manifestaciones severas y tardías de RMSF se caracterizan por un daño vascular sistémico, con la lesión del endotelio vascular y el infiltrado perivascular de las células mononucleares que producen vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar, microhemorragias y consumo de plaquetas (Walker, 1995; Thorne *et al.*, 1998). El edema pulmonar no cardiogénico (síndrome de dificultad respiratoria aguda), la neumonía intersticial y el edema cerebral, son consecuencias de estos daños al endotelio (Walker, 1995). La hiponatremia ocurre como resultado de la secreción apropiada de hormona antidiurética en respuesta a la hipovolemia, que junto con el shock hipotensor producen insuficiencia renal aguda

(Kaplowitz & Robertson, 1983; Walker e Ismail, 2008). De igual manera, la hipoalbuminemia se debe a una vasculitis inducida por daño capilar, y es responsable del edema periorbital, edema del dorso de las manos o pies (Walker, 1995; Parola *et al.*, 1997).

Otras manifestaciones de la enfermedad tardía son las diversas presentaciones neurológicas, como encefalitis, que conduce a estupor, coma y convulsiones, pérdida auditiva transitoria aguda, hemiplejia, letargo, fotofobia, meningitis, amnesia, entre otras (Hattwick *et al.*, 1978; Walker, 1995; Thorner *et al.*, 1998). Asimismo, produce daños oculares que incluyen conjuntivitis, edema del disco óptico, oclusión arterial, congestión de la vena retiniana, hemorragia y revestimiento retinianos (Hattwick *et al.*, 1978; Dantas-Torres, 2007). Por lo tanto, si no se trata a tiempo, se pueden producir lesiones graves que progresan a una falla multiorgánica y a la muerte del individuo (Biggs *et al.*, 2016).

2.1.8 Tratamiento

Los signos y síntomas clínicos iniciales son similares a los observados en otras enfermedades rickettsiales transmitidas por garrapatas, lo que dificulta el diagnóstico clínico y el tratamiento en esta etapa temprana (Thorner *et al.*, 1998).

Las tetraciclinas y el cloranfenicol son los únicos fármacos que han demostrado ser eficaces para el tratamiento de RMSF. Debido a su eficacia, amplio espectro y su fácil dosificación (Biggs *et al.*, 2016). La doxiciclina es el fármaco de elección para el tratamiento de la RMSF, excepto en pacientes que están embarazadas, ya que suponen un riesgo para el desarrollo del feto; en pacientes que se encuentran lactando, porque la doxiciclina se excreta en la leche a niveles bajos, sin embargo, se desconoce el grado de absorción en los lactantes; en pacientes que tienen alérgica al fármaco, y en niños menores de 9 años. Aunque están contraindicadas en estos niños por el riesgo de tinción dental, la doxiciclina sigue siendo el tratamiento de elección siempre y cuando se administre como una

terapia única, y en un corto tiempo (por ejemplo, de 5 a 10 días) (Thorner *et al.*, 1998; Dantas-Torres, 2007).

La duración exacta de la terapia antibiótica apropiada para esta enfermedad, esta relaciona con el curso de la enfermedad y la respuesta clínica, no así, con un número preciso de días; sin embargo, para la mayoría de estas infecciones, la terapia recomendada se debe continuar durante al menos 3 días después de que la fiebre del paciente haya disminuido. Sin embargo, los regímenes actuales recomendados para el tratamiento con doxiciclina son 100 mg/Kg por día dos veces al día para adultos y 2.2 mg/kg por días dos veces al día para niños que pesan menos de 45 kg. Estas dosis pueden administrarse por vía oral o intravenosa y el tratamiento debe mantenerse durante 5 a 7 días. La terapia intravenosa está indicada principalmente en pacientes hospitalizados, en particular para aquellos que presentan vómito, signos vitales inestables y síntomas neurológicos (Dantas-Torres, 2007; Biggs *et al.*, 2016).

Por otro lado, el cloranfenicol también se ha usado ampliamente para el tratamiento de RMSF y, aunque no es tan efectivo como la doxiciclina, éste se utiliza en mujeres embarazadas o lactando, así como para personas alérgicas a la doxiciclina. La dosis indicada de cloranfenicol es de 50-75 mg/kg/día, dividida en cuatro dosis, administradas durante 7 días, o hasta 2 días después de que la fiebre haya disminuido, pero su uso está limitado por los efectos secundarios que produce. En situaciones de alto riesgo, el uso de tetraciclinas podría estar justificado durante el embarazo (Dantas-Torres, 2007). También, en mujeres embarazadas se puede utilizar la Josamicina a una dosis de 3 g por día durante 7 días (Parola *et al.*, 2005).

Además de la terapia antibiótica contra *R. rickettsii*, se debe considerar otras terapias de mantenimiento o soporte, sobre todo en los pacientes gravemente enfermos, como la administración adecuada de líquidos intravenosos, el monitoreo de las presiones intravenosas para detectar y manejar el edema pulmonar no

cardiogénico, incluso si hay algún grado de azotemia prerrenal (Thorner *et al.*, 1998; Dantas-Torres, 2007).

Debido a que los casos fatales de FMMR a menudo se asocian con un diagnóstico tardío, es importante considerar ingresar al paciente cuando presente fiebre y erupción característica y administrarle la terapia antimicrobiana (Thorner *et al.*, 1998).

2.1.9 FMMR en perros

Varios estudios realizados en perros que fueron infectados experimentalmente con *R. rickettsii* mostraron que los signos clínicos, así como, las lesiones son características a las manifestaciones desarrolladas en humanos (Keenan *et al.*, 1977).

En estos animales, se observó un aumento de la temperatura corporal por encima de 39.5 °C después de los 3 - 7 días pos-infección, posteriormente los perros se observaron deprimidos progresando a estados letárgicos continuos o intermitentes, mostrando una disminución en el apetito hasta un rechazo total de los alimentos. De igual manera, se observaron temblores de cabeza, extremidades y cuerpo. En los días 6 - 11 pos-infección, se observaron petequias en encías y en la mucosa bucal, así como erupción cutánea maculopapular extensa principalmente en áreas expuestas de la piel, que comienza en las orejas y se extienden al tronco y las extremidades. Además, algunos perros mostraron salivación excesiva y edema escrotal. El cambio histopatológico fue una vasculitis necrotizante (Keenan *et al.*, 1977; Levin *et al.*, 2014).

Al igual que en los humanos el tratamiento de elección son las tetraciclinas, así como una terapia de soporte o mantenimiento que va de acuerdo con los signos y lesiones que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. La doxiciclina se recomienda a 5 mg/kg dos veces al día durante 14 - 27 días, vía oral;

adicionalmente se recomienda la enrofloxacin inyectable a 3 mg/kg IM dos veces al día durante 7 días, en animales graves; asimismo meloxicam en suspensión oral, 0,2 mg/kg una vez al día, posteriormente 0,1 mg/kg en los próximos dos días, como analgésico antiinflamatorio y la vitamina K para ayudar en la coagulación de la sangre (Levin *et al.*, 2014).

2.1.10 Diagnóstico

La FMMR es una enfermedad rickettsial que en su etapa inicial los signos y síntomas que presentan los pacientes son muy inespecíficos, por lo tanto, su diagnóstico temprano se dificulta. En un principio el diagnóstico se realiza de acuerdo con la llamada triada de la enfermedad que se basa en la aparición de la fiebre, la presencia de erupciones características en la piel y una historia clínica donde los pacientes detallen sus actividades, el lugar donde viven, si tienen mascotas y si éstas presentan garrapatas, y/o algunos otros antecedentes que puedan decir si han tenido contacto con garrapatas (Walker *et al.*, 2008).

A la fecha, se han desarrollado numerosos métodos de laboratorio para la confirmación del agente causal *R. rickettsii*, que incluyen pruebas serológicas, inmunohistológicas, aislamiento en cultivos, amplificación por PCR de ADN de la bacteria, entre otros (cuadro 3). Sin embargo, cada una de estas pruebas varía en disponibilidad, tiempo para obtener resultados, características de rendimiento, costos, así como especificidad (Esp) y sensibilidad (Se) (La Scola & Raoult, 1997).

2.1.10.1 Métodos Serológicos

Las pruebas serológicas son las que se utilizan con mayor frecuencia para el diagnóstico de *R. rickettsii*, pero usualmente no son útiles al inicio de la enfermedad o fase aguda, ni en pacientes convalecientes, porque los anticuerpos son detectables de 7 - 10 días después del inicio de los síntomas (Kaplan & Schonberger, 1986; Thorner *et al.*, 1998). Además, estas pruebas no distinguen el agente etiológico entre el grupo de Fiebre Manchada o el grupo Tifus y generan

una reacción cruzada (Walker *et al.*, 2008). Asimismo, los índices de sensibilidad en la mayoría de los métodos son bajos, y requieren un aumento de 4 veces o más en el título de anticuerpos en muestras pareadas, o un título en pacientes convalecientes mayor que 1/64, para aumentar la sensibilidad (Kaplan & Schonberger, 1986).

Weil-Felix (*Proteus* OX-19, OX-2)

Es el método serológico más antiguo que se utiliza, presenta la sensibilidad más baja de los métodos serológicos; el 70% para *Proteus* OX-19, y 47% para *Proteus* OX-2, así como, poca especificidad (Kaplan & Schonberger, 1986; Thorner *et al.*, 1998). Esta técnica se basa en la detección de anticuerpos por medio de aglutinación. Los anticuerpos aglutinantes se detectan de 5 - 10 días después del inicio de los síntomas, y son anticuerpos tipo IgM. Este método da falsos positivos, por que hace reacción cruzada con enfermedades rickettsiales y no rickettsiales, como *Proteus* spp, infecciones urinarias, *Leptospira* spp, infecciones por *Borrelia* spp, durante la gestación y enfermedades graves del hígado (Walker *et al.*, 1980).

Inmunofluorescencia Indirecta (IFA)

La IFA es el método serológico más sensible disponible (sensibilidad 94%) y es un método utilizado como referencia en muchos laboratorios (Kaplan & Schonberger, 1986), considerada el estándar de oro en el diagnóstico de FMMR. Sin embargo no distingue entre la infección por *R. rickettsii* y otras rickettsias del grupo de la fiebre manchada (Thorner *et al.*, 1998). La IFA detecta anticuerpos IgM e IgG. Los niveles de IgG se elevan 2 - 3 semanas después de la infección y perduran durante 3 - 5 meses, mientras que IgM aumenta sus niveles antes que IgG, alcanzando su nivel máximo de 4 - 8 semanas después de la infección y luego disminuyen. Para considerar un resultado positivo en IFA, la IgG debe tener un título de 64 o más, y la IgM, debe tener títulos mayores o iguales a 8, además de considerar los signos clínicos (Stiles, 2000).

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

La técnica de ELISA desarrolló principalmente para la detección de anticuerpos contra *Rickettsia typhi* y *Rickettsia prowazekii* y posteriormente se adaptó para el diagnóstico de FMMR. Es un método altamente sensible y reproducible, permitiendo la diferenciación entre los anticuerpos IgG e IgM (La Scola & Raoult, 1997). Esta técnica es útil en la etapa temprana y la convalecencia tardía de la enfermedad ya que detecta niveles bajos de anticuerpos presentes, además presenta una sensibilidad del 100% y una especificidad del 99% (Clements *et al.*, 1983).

Fijación de complemento (CF)

Esta técnica se basa en la reacción antígeno-anticuerpo. Se adaptó para la detección de anticuerpos específicos de especie para el grupo SFG y TG, pero aún al ser antígenos específicos de especie se observa reacción cruzada entre los grupos. Presenta una especificidad del 63% (Kaplan & Schonberger, 1986), y llega a ser menor en la fase aguda de la enfermedad. Sin embargo, se ha visto que si bien el uso de 8 U de antígeno en esta fase aumenta la sensibilidad de detección de IgM, también aumenta el número de reacciones cruzadas entre los grupos. Además, los resultados también pueden variar conforme al método de obtención del antígeno y la cantidad utilizada en la prueba (La Scola & Raoult, 1997).

Hemaglutinación indirecta (IHA)

Esta técnica se basa en el principio de la inhibición de la hemoaglutinación. Tiene una sensibilidad del 96% (Kaplan & Schonberger, 1986). Se utilizan glóbulos rojos sensibilizados con el antígeno para la detección de anticuerpos contra éste. Esta prueba detecta anticuerpos IgG e IgM, pero es más eficiente con los anticuerpos IgM. Sin embargo, llega a presentar reacción cruzada con otras rickettsias (La Scola & Raoult, 1997). Es especialmente útil para el diagnóstico de infecciones agudas.

Aglutinación de látex (LA)

Se basa en el mismo principio que la hemaglutinación indirecta, utiliza perlas de látex en lugar de eritrocitos. Es una prueba es rápida que aproximadamente tarda 15 minutos en realizarse y no requiere instrumentación elaborada. Detecta anticuerpos IgG e IgM, pero es más eficiente cuando la proporción de IgM / IgG antirickettsial es 1. Presenta una sensibilidad del 71%, se puede usar en la fase aguda de la enfermedad, además los títulos de anticuerpos significativos desaparecen después de 2 meses (La Scola & Raoult, 1997). Su principal inconveniente es el costo de los reactivos, aunque no requiere equipos costosos.

2.1.10.2 Métodos inmunohistológicos

Estas técnicas se han utilizado para demostrar *R. rickettsii* en biopsias de piel durante la etapa aguda de RMSF. La sensibilidad y especificidad de la inmunofluorescencia directa y la tinción de inmunoperoxidasa son idénticas, alrededor del 70% para la sensibilidad y del 100% para la especificidad en manos de un microscopista experimentado (Woods & Walker, 1996).

La inmunofluorescencia directa se limita a los pacientes con erupción cutánea (Thorner *et al.*, 1998). Primero se toma una biopsia de 3 mm a 4 mm que debe incluir un foco de vasculitis en el centro de la muestra, luego son fijados con formalina y embebidos en parafina para su posterior estudio. Este método es rápido y requiere de pocas horas. Las muestras con un mayor número de rickettsias son más rápidas en examinarse que las que no están infectadas o tienen una infección mínima (Woods & Walker, 1996; Procop *et al.*, 1997). Sin embargo, este método requiere de laboratorios especializados, de equipo especial como un microscopio de fluorescencia, así como, de un observador calificado que pueda interpretar las muestras (fondo de color azul, formas rickettsiales verde fluoresceínicas, lisosomas naranja ceroides y amarillos) (Dumler *et al.*, 1990; Walker *et al.*, 2008).

Por otro lado, la técnica de Inmunoperoxidasas, tiene algunas ventajas sobre la técnica de inmunofluorescencia; estas incluyen la localización más fácil de antígenos y la visualización conjunta con la histopatología (Procop *et al.*, 1997). Requiere poco equipo especializado, se puede realizar tanto en muestras embebidas en parafina como en secciones congeladas con o sin foco de vasculitis. Son más fáciles de leer, se utilizan microscopios de luz y es adaptable para su uso en muchos laboratorios y/o hospitales poco equipados (Dumler *et al.*, 1990) En última instancia, se pueden detectar rickettsias rápidamente en la sangre periférica, en algunos casos (Walker *et al.*, 1978).

2.1.10.3 Métodos Moleculares

Nuevas PCR se han desarrollado para la detección y cuantificación de *R. rickettsii* y otras rickettsias del grupo con fiebre manchada en diferentes tipos de muestras. Estas técnicas pueden ofrecer ventajas en términos de velocidad, sensibilidad y reproducibilidad en comparación con la PCR convencional (Dantas-Torres *et al.*, 2007).

La detección por PCR se ha basado en la amplificación del gen que codifica la proteína de 17 kDa que se encuentra en todas las especies rickettsiales probadas, sin embargo, contiene secuencias en el extremo 3' que son exclusivas de *R. rickettsii* y *R. conorii* (Tzianabos *et al.*, 1990). También, se utiliza la amplificación de los genes *ompA* y *gltA* (La Scola & Raoult, 1997).

El uso de la PCR para el diagnóstico de RMSF es limitado debido a su baja sensibilidad para detectar el ADN de *R. rickettsii* en muestras de sangre particularmente al inicio de la enfermedad. El número de rickettsias que circulan en la sangre suele ser bajo, en la etapa aguda de la enfermedad o en una infección fulminante y los límites de detección pueden estar por debajo. Esta técnica parece ser más útil para la detección de *R. rickettsii* en una biopsia de piel o en una muestra

de tejido de necropsia. Las muestras obtenidas correctamente y la re-amplificación de los productos de PCR con un par adicional de cebadores anidados aumentan los límites de detección. Lo cual ayuda a reducir el número de resultados falsos negativos de los pacientes en las primeras etapas de la infección por RMSF (Tzianabos *et al.*, 1990). Asimismo, se ha observado que el tratamiento con doxiciclina disminuye la sensibilidad de la PCR, por lo tanto, se recomienda obtener sangre para las pruebas moleculares antes de administrar agentes antibacterianos para minimizar la probabilidad de un resultado falso negativo (Walker 1995; Biggs *et al.*, 2016).

2.1.10.4 Cultivo Celular

El cultivo representa el estándar de referencia para el diagnóstico microbiológico; sin embargo, no son ampliamente disponibles, ya que se necesitan laboratorios equipados y técnicos con experiencia capaces de realizar el aislamiento de *R. rickettsii*. Además, el CDC (Centros de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos) en año 2000, clasificó a *R. rickettsii* como agente tipo C de bioterrorismo, y posteriormente en el 2009, como un agente de bioseguridad nivel 3 (BSL-3) que solo se deben trabajar con autorización del Gobierno y en laboratorios autorizados, que tengan este nivel de bioseguridad (Biggs *et al.*, 2016).

Cuadro 3. Características principales de las de los diferentes métodos de diagnóstico para *R. rickettsii*.

Técnica	Etapas de la enfermedad	Muestra	Características
Weil-Felix (<i>Proteus</i> OX-19, OX-2)	5 -10 días post infección (PI)	Suero	70% <i>Proteus</i> OX-19 47% <i>Proteus</i> OX-2 IgM; falsos positivos; reacción cruzada.
Fluorescencia Indirecta por Anticuerpos	Segunda semana PI	Suero	94% Se; estándar de oro; IgM e IgG; no distingue entre las rickettsias del grupo SFG.
ELISA	Fase aguda	Suero	100% Se; 99% Es; distingue entre IgM e IgG; largo proceso de purificación.
Hemaglutinación indirecta	Fase aguda	Suero	96% Se; IgG e IgM; reacción cruzada con otras rickettsias.
Aglutinación de látex	Fase aguda	Suero	71% Se; IgG e IgM; costo de los reactivos.
inmunofluorescencia Directa	Fase aguda	Biopsia de piel	70% Se; 100% Es; equipo especializado; el 10% de los pacientes no presenta lesiones.
Inmunoperoxidasas	Fase aguda	Biopsia de piel	70% Se; 100% Es; microscopio de luz; tejido embebido en parafina y congelado.
PCR	Fase aguda	Sangre, tejido infectado	rápido, sensible y reproducible; en sangre fase aguda no eficiente; equipo especializado y caro.
Cultivo celular	Fase aguda	Sangre, tejido infectado	Baja sensibilidad, laboratorio especializado BSL-3; técnico capacitados, bioterrorismo.

2.2 Amplificación isotérmica basada en horquillas LAMP (Loop-mediated isothermal amplification).

LAMP es un método que amplifica ácidos nucleicos en condiciones isotérmicas, con alta sensibilidad y especificidad. Fue desarrollado por Notomi *et al.*, en el año 2000. Se basa en la síntesis de ADN de desplazamiento de cadena de autociclo, que se lleva a cabo mediante una enzima con alta actividad de desplazamiento (ADN Polimerasa *Bst* de *Bacillus stearothermophilus*) y un conjunto de cuatro oligonucleótidos: dos internos (FIP y BIP) y dos externos (B3 y F3) que reconocen seis regiones separadas dentro de una secuencia de ADN blanco (Notomi *et al.*, 2000).

La reacción LAMP se desarrolla en tres pasos, en el primero es la formación de ADN de tallo-horquilla que sirve como material de inicio para la reacción, el segundo paso, es el ciclo de amplificación aquí se inicia la síntesis de ADN por desplazamiento de cadena produciendo una estructura tallo-horquilla original y una nueva estructura tallo-horquilla, donde el tallo es del doble de largo. Posteriormente la elongación, como paso final, donde se forman varias repeticiones invertidas del ADN blanco y una estructura en forma de coliflor con múltiples horquillas (Nagamine *et al.*, 2002).

La eficiencia de amplificación del método LAMP es extremadamente alta (10^9 copias de DNA blanco en menos de una hora) ya que es una reacción isotérmica. Además, este método sintetiza 10 a 20 μg de ADN específico para una mezcla de reacción de 25 μl en 30–60 minutos (Mori *et al.*, 2001).

2.2.1 Fundamento

En el fundamento de la técnica se usan dos oligonucleótidos internos que se denominan por sus siglas en inglés, Forward Inner Primer (FIP) y Back Inner Primer (BIP), y cada uno contiene dos secuencias distintas correspondientes a las secuencias sentido y antisentido del ADN blanco, uno para sintetizar en la primera etapa y otro para auto síntesis en etapas posteriores. Las secuencias (23–24 nucleótidos) dentro de ambos extremos de la región objetivo para la amplificación en un ADN se les llama como F2c y B2, respectivamente. Dos secuencias internas cortas (23-24 nucleótidos) ubicadas a 40 nt del extremo de F2c y B2 se nombran como F1c y B1 y dos secuencias (17–21 nt) fuera de los extremos de F2c y B2 se nombran como F3c y B3. Dada esta estructura, las secuencias de FIP y BIP se diseñaron de la siguiente manera. FIP contiene la secuencia F1c, un espaciador TTTT y la secuencia F2 complementaria a F2c. BIP contiene la secuencia B1c complementaria de B1, un espaciador TTTT y la secuencia B2 complementarias a B2c. Los dos oligonucleótidos externos consisten en la secuencia B3 y la secuencia F3 complementaria a B3c y F3c, respectivamente (figura 7). Una muestra de ADN que contiene, tanto la secuencia blanco como los cuatro oligonucleótidos, se desnaturaliza por calor y se enfría rápidamente en hielo. La reacción de LAMP se inicia inmediatamente después de la adición de la enzima *Bst* polimerasa y se lleva a cabo a 65 °C durante 1 h (figura 8) (Notomi *et al.*, 2000).

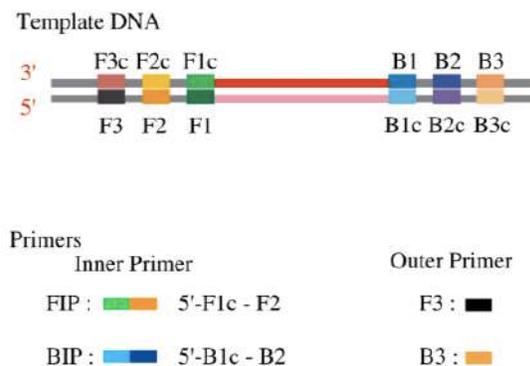
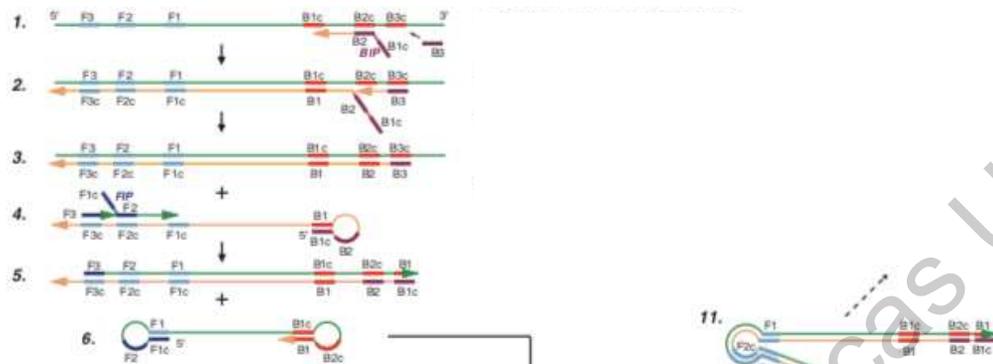
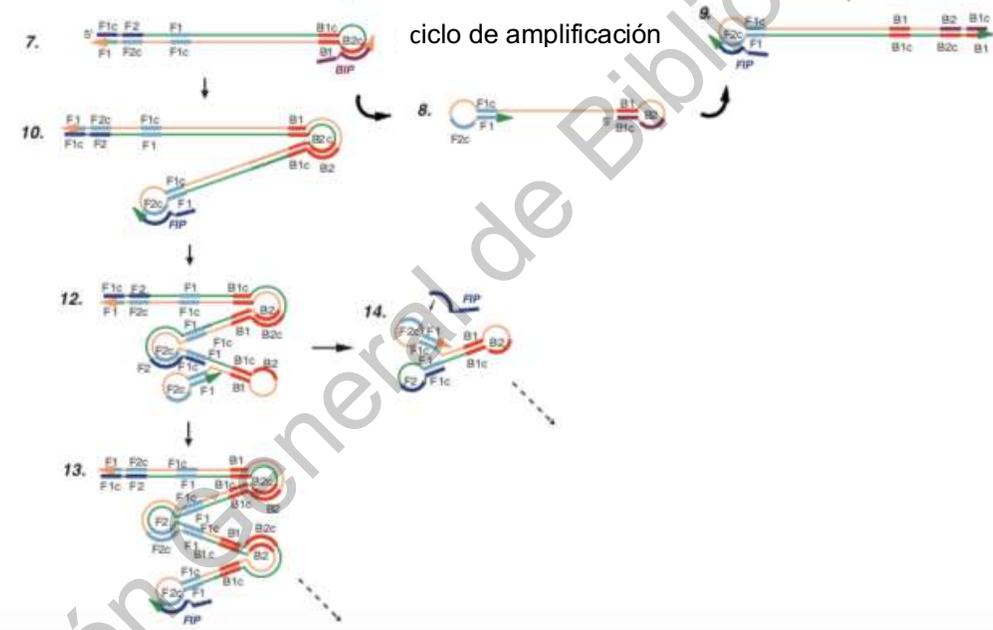


Figura 7. Regiones del ADN blanco (imagen de arriba), dos oligonucleótidos internos (imagen de abajo, izquierda) y dos oligonucleótidos externos (imagen de abajo, derecha) utilizados en el método LAMP (Mori *et al.*, 2004).

Formación de la estructura tallo-horquilla



ciclo de elongación



ciclo de amplificación

Figura 8. Reacción LAMP. Se muestran los tres pasos de la reacción: Formación de la estructura tallo-horquilla, ciclo de amplificación, y elongación. La reacción LAMP inicia cuando el oligonucleótido interno FIP se hibrida a F2c en el ADN blanco e inicia la síntesis de la cadena complementaria [1]. El oligonucleótido externo F3, que es menor a en concentración a FIP, se hibrida lentamente a F3c en el ADN diana e inicia la síntesis de ADN por desplazamiento de cadena [2], liberando la cadena complementaria unida a FIP [3], formando una estructura en forma de horquilla en uno de los extremos. Este ADN

monocatenario sirve como plantilla para el inicio de la síntesis de ADN por BIP y la subsiguiente síntesis de ADN por desplazamiento de cadena sintetizada por B3 [4], lo que lleva a la producción de un ADN en forma de campana muda, que se convierte rápidamente en un ADN de tallo-horquilla por síntesis de ADN auto-sintetizada [6]. Este ADN de tallo-horquilla sirve como material de partida para el ciclo de amplificación, el segundo paso de la reacción LAMP (Notomi *et al.*, 2000). Para iniciar el ciclo de amplificación, FIP se hibrida a la horquilla en la estructura de tallo-horquilla y la ceba [7], generando un ADN de tallo-bucle con un agujero intermedio y una copia invertida adicional de la secuencia blanco en el tallo, y en el extremo opuesto forma una horquilla a través de la secuencia BIP [8]. La síntesis y el desplazamiento de la cadena de ADN auto-cebada produce una estructura complementaria del ADN tallo-horquilla original [10], un ADN de tallo-horquilla con un tallo doblemente alargado (copias dobles de la secuencia diana) y una horquilla en el extremo opuesto [9]. Ambos productos sirven como plantilla para una reacción de desplazamiento de cadena sintetizada con BIP en los ciclos subsiguientes, parte que corresponde al paso de elongación y reciclaje. Por lo tanto, en LAMP, la secuencia blanco se amplifica 3 veces cada medio ciclo. Los productos finales son una mezcla de ADN de tallo-horquilla con varias longitudes de tallo y estructuras similares a coliflor con múltiples bucles formados por recocido entre repeticiones invertidas alternativamente de la secuencia blanco en la misma cadena [10-14] (Notomi *et al.*, 2000; Nagamine *et al.*, 2002).

Adicionalmente, Nagamine *et al.*, en el 2002 optimizaron la técnica incluyendo oligonucleótidos adicionales, llamados oligonucleótidos Loop (LF, LB) los cuales se hibridan en las estructuras de horquilla amplificadas con los oligonucleótidos externos. Para acelerar la reacción LAMP, los oligonucleótidos Loop actúan en el paso de elongación (figura 9), aumentan la sensibilidad y disminuyen los tiempos de reacción, menos de 1 h, que el método LAMP original (Nagamine *et al.*, 2002).

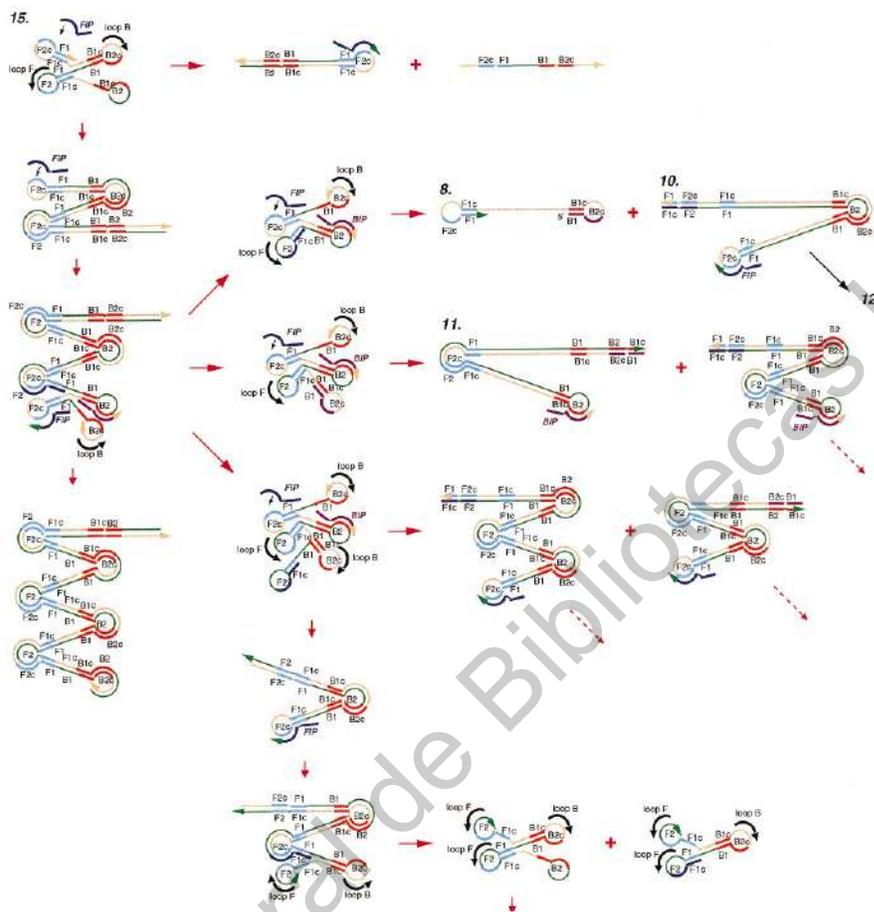


Figura 9. Reacción LAMP con uso de oligonucleótidos Loop. El oligonucleótido Loop B se hibrida a una región horquilla en la estructura **12** e inicia la síntesis de ADN. Este ADN sintetizado es desplazado a partir del extremo 3' del ADN blanco formando la estructura **15**, (que no está presente en la LAMP original). La estructura 12 también es hibridada en otro tallo-horquilla por FIP. Las estructuras **8**, **10** y **11** son recicladas en la reacción LAMP (modificado de Nagamine *et al.*, 2002).

2.2.2. Análisis del producto amplificado de la reacción LAMP

La electroforesis es la técnica utilizada en un principio para el análisis del producto amplificado de la reacción LAMP utilizando gel agarosa al 2% (Notomi *et al.*, 2000). Sin embargo, se han desarrollado otras técnicas que permiten la observación visual y la cuantificación de los resultados. Uno de ellos se basa en la turbidez derivada del precipitado que se produce de acuerdo con el progreso de la reacción LAMP. Este precipitado se forma cuando la ADN polimerasa polimeriza el ADN, liberando ion pirofosfato que reacciona con el ion magnesio del buffer utilizado en la mezcla LAMP, formando pirofosfato de magnesio, el cual se precipita (Mori *et al.*, 2001).

Posteriormente, en el año 2004, Mori y colaboradores, diseñaron un aparato (turbidímetro en tiempo real) para realizar mediciones de turbidez en tiempo real de las reacciones LAMP manteniendo la temperatura óptima (60-65 °C), el cual mide continuamente la turbidez de múltiples muestras simultáneamente y además es un método cuantitativo.

Sin embargo, estos métodos son débilmente visibles y requieren equipos especializados. Por lo tanto, se adaptaron métodos colorimétricos a la reacción de LAMP, que consisten en medir la concentración de una solución mediante el cambio de color utilizando un indicador metálico (Tomita *et al.*, 2008).

Tomita *et al.*, en el 2008, desarrollaron una técnica de detección visual simple, basado en el principio del ion pirofosfato y la adición de un ion metálico divalente. Este método se basa en la visualización por medio de fluorescencia. Utilizaron ion manganeso y calceína como indicadores fluorescentes. Donde se adiciona calceína combinada con ion manganeso en la mezcla de la reacción, esto permite mantener a la calceína inactiva, y cuando se inicia la reacción de amplificación, el ion pirofosfato se une al ion manganeso y libera la calceína, lo que resulta en la emisión de fluorescencia.

2.2.2.1. Interpretación visual utilizando azul de hidroxinaftol

Siguiendo con el principio observado por Mori y colaboradores (2001), Goto *et al.*, en el año 2009, desarrollaron un nuevo método de detección visual con el uso de un indicador de ion metálico, azul de hidroxinaftol (HNB).

El HNB ayuda a monitorear el cambio en la concentración de iones magnesio, en condiciones alcalinas (pH 8.8 a 25 °C), provistas por la *Bst* ADN polimerasa cuando sintetiza el ADN. El cambio de color del HNB depende del pH de la solución; cuando la solución presenta un pH de 8.6 - 9.0 y contiene 8 mM de iones Mg^{2+} y no tiene dNTP's (desoxirribonucleótidos trifosfato), su color es magenta. Cuando se agrega 1.4 mM de dNTP's a esta solución, el color del HNB cambia de magenta a violeta sin depender del pH. Este cambio de color se produce por la quelación de iones Mg^{2+} por los dNTP's. Por lo tanto, el cambio de color del HNB de violeta a azul cielo indica una reacción positiva (figura 10) (Goto *et al.*, 2009).

Una concentración final de 120 μ M en la reacción de LAMP usando HNB puede detectar ADN a diluciones $\leq 1:10^8$ (160 copias/tubo). Este ensayo colorimétrico de LAMP tiene algunos beneficios en comparación con otras técnicas: es de fácil elaboración, no requiere de equipo especial, presenta alta sensibilidad, reduce los riesgos de contaminación y es útil en la detección de ADN y ARN de alto rendimiento (Goto *et al.*, 2009).



Tubo 1: dilución 1:10³ (1.58x10⁷ copias/tubo).
tubo 2: dilución 1:10⁴; tubo 3: dilución 1:10⁵;
tubo 4: dilución 1:10⁶; tubo 5: dilución 1:10⁷;
tubo 6: dilución 1:10⁸; tubo 7 dilución 1:10⁹
tubo 8: control negativo.

Figura 10. Detección visual de la reacción, comparando la sensibilidad usando diluciones seriadas de DNA (Modificada de Goto *et al.*, 2009).

2.3 Validación de un método de diagnóstico

La validación de un método de diagnóstico es un proceso que determina la idoneidad de éste, es decir, que el método cumpla con el objetivo para el cual fue desarrollado, optimizado y estandarizado (Ochoa & Orejas, 1999). Para que este método sea validado debe presentar características de rendimiento analítico y diagnóstico.

El proceso de validación abarca dos etapas principales: que son la etapa de desarrollo y la etapa de validación del método. Cada una estas etapas a su vez presenta criterios de validación (figura 11), que se deben cumplir en conjunto para que se considere validado el método (OIE, 2018).

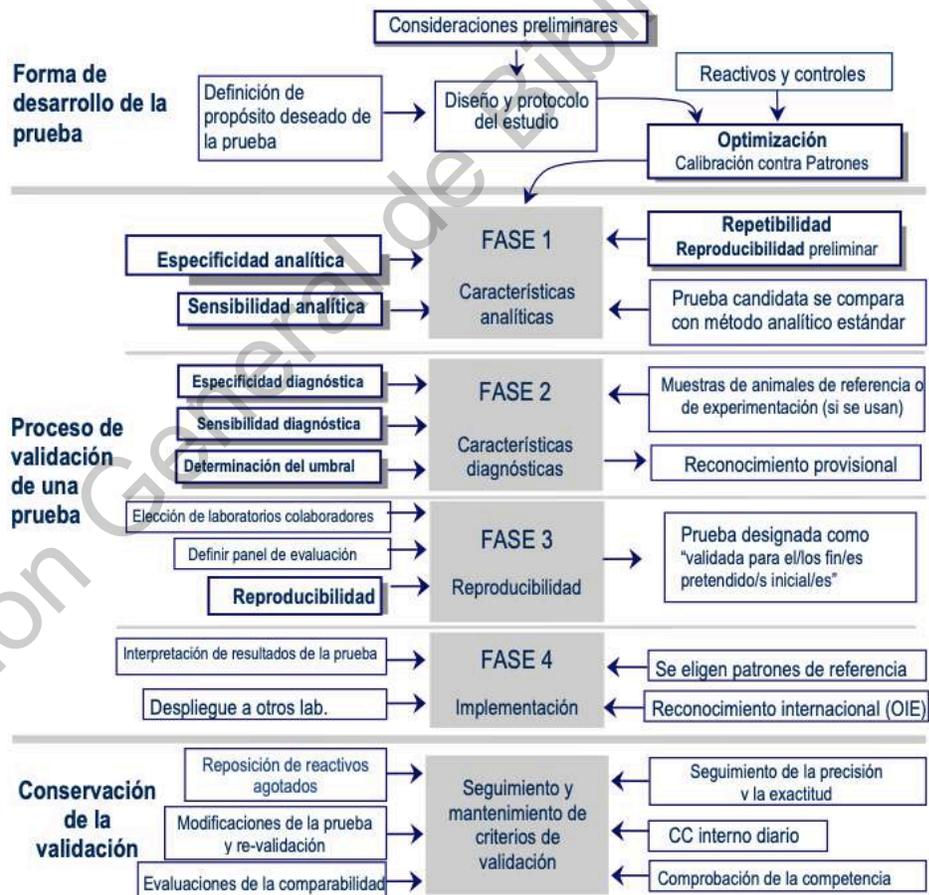


Figura 11. Proceso de validación de una prueba de diagnóstico (OIE, 2018).

2.3.1. Etapa de Desarrollo

Para esta etapa los criterios de validación que se consideran son: el propósito deseado, el diseño y la optimización del método. En el propósito del método se define su contexto, su aplicación y su fin, así como, la especie de destino, el agente patógeno y el tipo de muestra a analizar. El diseño depende de las muestras de referencia, el agente buscado, donde se encuentra, y la población de estudio. En la optimización se evalúan los parámetros físicos, químicos y biológicos del método. Dentro de estos parámetros se encuentran varios criterios a evaluar; uno es el intervalo de funcionamiento que determina los límites inferior y superior de las concentraciones del analito u agente. Para determinar este intervalo, se selecciona una muestra de referencia positiva alta y se lleva a cabo una dilución seriada de la misma. Los resultados se colocan en una "curva de respuesta" que establece el intervalo de funcionamiento del método. La estandarización es un criterio crucial a tomar en cuenta, aquí se describe a detalle todo el procedimiento y reactivos que se utilizan y se establecen las condiciones de trabajo, la concentración, los intervalos de los tiempos de reacción y las temperaturas, así como el equipo, sus especificaciones de funcionamiento y calibración. Además, se describe la obtención e interpretación de los datos obtenidos durante el proceso de estandarización del método. Otro criterio a evaluar es la robustez, que es la capacidad del método a no ser afectado por pequeños cambios en las condiciones durante su análisis, ya que este criterio es de suma importancia, para la evaluación de la reproducibilidad y repetibilidad al momento de la transferencia del método a otros laboratorios. Por último, la utilización de estándares de referencia, calibración y normalización. Se recomienda la utilización de estándares de referencia para la validación del método, ya que estos cuentan con concentraciones conocidas, se caracterizan mediante un profundo análisis, se preparan y almacenan por expertos (TDR, 2010; OIE, 2018).

2.3.2. Etapa de Validación

En esta etapa se busca que el método, después de la etapa de desarrollo y de someterlo a estudios de comparación siga rindiendo como se plantea en su objetivo inicialmente. Esta etapa cuenta de cuatro fases para que el método analizado sea validado y cada una de estas fases cuenta con sus criterios de validación.

2.3.2.1. Fase 1: Características analíticas del método

Repetibilidad: es el grado en que los resultados del análisis de la misma muestra o muestras obtenidos en diferentes repeticiones con el mismo método analítico y en un mismo laboratorio, sea igual. Por lo tanto, las muestras elegidas para determinar la repetibilidad deben analizarse como muestras de diagnóstico individuales, trabajándolas con todos los pasos, desde la preparación de la muestra hasta el análisis de datos, esto disminuye la variación en la repetibilidad del método, ya que una variabilidad alta genera una interpretación errónea (TRD, 2010).

Especificidad analítica: es la capacidad que tiene un método para distinguir entre el analito o agente patógeno buscado y no buscado, incluidos los componentes de la muestra. Aquí se define el propósito y el tipo de método. Es decir, para el propósito se define que analito(s) o agente(s) patógeno(s) se van a evaluar y el tipo de método, se refiere a si va ser una prueba de escrutinio (tamiz) o confirmatoria, y esto depende si la especificidad analítica es baja o alta, así como, si hay reacciones cruzadas. Lo cual puede ser aceptable en función del uso propuesto de la prueba (OIE, 2018).

Sensibilidad analítica: Es el límite de detección del método del analito o agente patógeno en estudio, es decir, es la cantidad misma del agente patógeno (o analito) que produciría un resultado positivo. Lo cual puede ser por una serie de diluciones del analito o agente patógeno o por medio de un constructo de plásmido que contenga la secuencia diana y analizarlo en una serie de diluciones, en caso de

una prueba molecular. De esta manera, puede estimarse el número de copias detectable mediante el método analítico (OIE, 2018).

Exactitud analítica de las pruebas: son los métodos o procedimientos complementarios secundarios, por ejemplo, la neutralización vírica hasta la tipificación o la secuenciación molecular de un virus aislado (TDR, 2010).

2.3.2.2. Fase 2: Características diagnósticas del método

Especificidad diagnóstica (D_{Sp}): es la proporción de muestras de animales de referencia que se sabe que no están infectados y que dan negativo en una prueba.

Sensibilidad diagnóstica (D_{Se}): es la proporción de muestras de animales de referencia que se sabe que están infectados y que dan positivo en una prueba.

La sensibilidad y especificidad diagnóstica son los indicadores principales de rendimiento de un método de diagnóstico. En esta fase es importante la elección de las muestras a analizar que represente a la población de estudio para la cual fue diseñado el método, así como el número de muestras, la elección de las muestras positivas y negativas. Por lo tanto, se debe utilizar un diseño de muestreo adecuado. El número designado de muestras que se sepa que son positivas y muestras que se sepa que son negativas dependerá de cuáles sean los valores probables de D_{Se} y de D_{Sp} de la prueba candidata, el error permitido y del nivel de confianza deseado para las estimaciones. El tamaño de la muestra puede resultar limitado por la disposición de poblaciones de referencia, por el porcentaje de error a utilizar, así como el nivel de confianza (Cuadro 4) (Ghaaliq & McCluskey, 2008; OIE, 2018)

Cálculo de sensibilidad y especificidad diagnósticas: Primero se tiene que determinar el umbral de corte. Y definir las categorías a evaluarse: dos para positivo y negativo o tres para positivo, negativo y no concluyente. Posteriormente el

método ha evaluar se compara en forma cruzada con un método estándar en una tabla de 2x2, donde a partir de la cual se obtiene la estimación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica del nuevo método (Cuadro 5) (TDR, 2010).

Cuadro 4. Tamaño de muestras para estimar la sensibilidad y especificidad diagnóstica, de acuerdo al error permitido y nivel de confianza.

Estimación de DSe o DSp	2% de error permitido en la estimación de la DSe y la DSp			5% de error permitido en la estimación de la DSe y la DSp		
	Confianza			Confianza		
	90%	95%	99%	90%	95%	99%
90%	610	864	1493	98	138	239
92%	466	707	1221	75	113	195
94%	382	542	935	61	87	150
95%	372	456	788	60	73	126
96%	260	369	637	42	59	102
97%	197	279	483	32	45	77
98%	133	188	325	21	30	52
99%	67	95	164	11	15	26

(OIE, 2018).

Con la misma tabla de 2x2 se estiman los valores predictivos, tanto positivos como negativos. El valor predictivo positivo (VPP) es la probabilidad de que un animal que haya dado positivo en la prueba realmente sea positivo según el diagnóstico real. El valor predictivo negativo (VPN) es la probabilidad de que un animal que ha dado negativo en la prueba de sea negativo según el diagnóstico real (Staquet *et al.*, 1981; Ghaaliq & McCluskey, 2008).

Cuadro 5. Estimación de sensibilidad y especificidad diagnóstica en una tabla 2x2.

		Enfermedad		
		Presente	Ausente	
Prueba diagnóstica	+	Verdadero positivo a	Falso positivo b	a + b Valor predictivo positivo = a/(a + b)
	-	Falso negativo c	Verdadero negativo d	c + d Valor predictivo negativo = d/(c + d)
		a + c	b + d	a + b + c + d Prevalencia = a + c/(a + b + c + d)
		Sensibilidad = a/(a + c)	Especificidad = d/(b + d)	

Estándar de referencia: Todos los métodos que se requieran validar, siempre que sea posible deben compararse con un estándar de referencia (estándar de oro). La elección de un estándar de referencia óptimo para la comparación debe ser fiable. También se debe tomar en cuenta el tipo de método, por ejemplo, un método serológico no debe ser comparado con un método que detecta microorganismo directamente (TDR, 2010). La mayoría de los estándares de referencia, al igual que otras pruebas, pueden presentar diferentes características no ideales ya que pueden ser costosos, invasivos o poco prácticos, y a veces se puede utilizar la prueba de diagnóstico recientemente desarrollada en lugar del estándar de referencia (Van Stralen *et al.*, 2009).

Cuando el estándar de referencia es imperfecto, que es lo habitual en cualquier prueba de diagnóstico, las estimaciones de la sensibilidad y especificidad diagnóstica para el método nuevo que se basen en este estándar no serán perfectas y esto se debe a que los nuevos métodos de diagnóstico son más sensibles que el estándar de referencia (TDR, 2010). Una forma de superar este problema es llevar a cabo un análisis de clases latentes de los resultados conjuntos de ambas pruebas asumiendo que ninguna prueba es perfecta. En el caso de las pruebas de NAD que se utilizan en tales circunstancias, sería una buena práctica confirmar los resultados positivos de la PCR mediante secuenciación (OIE, 2018).

Sin embargo, un estándar de referencia con una sensibilidad y especificidad perfectas (100%) no está disponible y, en esos casos, las medidas de precisión de una nueva prueba de diagnóstico solo se pueden comparar con un estándar imperfecto, lo que da como resultado estimaciones incorrectas de las medidas de precisión de la nueva prueba (Van Stralen *et al.*, 2009).

Concordancia: es el grado en que dos o más métodos obtengan resultados equivalentes sobre el mismo fenómeno observado. Asimismo, ayuda a la toma de decisiones en reemplazar el método nuevo por el anterior, ya sea porque es más sencillo, menos costoso, más fiable y útil. Para evaluar la concordancia se han diseñado dos modelos estadísticos que estiman el grado de acuerdo existente entre dos o más observaciones, son: concordancia de variables categóricas, que se determina de manera binaria o dicotómica, positivo o negativo. Y concordancia para variables de tipo continuo, donde su análisis es medido por una variable numérica continua (Diamon, 1992; Ochoa & Orejas, 1999)

La concordancia de variables categóricas en el caso de métodos binarios, se utiliza el índice kappa, un instrumento diseñado por Cohen para cuantificar la concordancia más allá del azar entre el método de prueba y el método estándar. (Diamon, 1992). La ecuación para la estimación por el índice de Kappa es:

$$\text{Kappa} = \frac{P_0 - P_e}{1 - P_e}$$

P_0 : es la proporción de concordancia observada,

P_e : es la proporción de concordancia esperada por azar y

$1 - P_e$: representa el acuerdo o concordancia máxima posible no debida al azar.

Por lo tanto, el índice kappa oscila entre 0 (nada de coincidencia) y 1 (perfecta coincidencia) (cuadro 6) (Landis & Koch, 1977).

Cuadro 6. Grado de concordancia en función del índice Kappa.

Índice Kappa	< 0	0 - 0,2	0,2 – 0,4	0,4 – 0,6	0,6 – 0,8	0,8 - 1
Grado de concordancia	Sin acuerdo	Insignificante	Bajo	Moderado	Bueno	Muy bueno

(Landis & Koch, 1977).

Se debe tener en consideración que el uso de este criterio de validación tiene un valor limitado y, a menudo, es difícil de interpretar, ya que depende de la sensibilidad, la especificidad de ambas pruebas y la prevalencia de la infección (TDR, 2010).

Razón de verosimilitud (RV) o cociente de probabilidades: es el cociente de dos probabilidades: la probabilidad de que un resultado de una prueba en pacientes con la enfermedad entre la probabilidad de ese resultado de la prueba en pacientes sin la enfermedad, es decir, indica cuánto es más probable obtener un determinado resultado (positivo o negativo) en presencia o ausencia de la enfermedad. Las razones de verosimilitudes van desde 0 hasta infinito. Por lo tanto, las pruebas con razones de probabilidad altas son mejores que aquellas con razones de probabilidad bajas en el caso del cociente de probabilidad positivo, y del caso contrario en el negativo (cuadro 7) (Douglas, 1993; Ghaaliq & McCluskey, 2008).

Ecuaciones para calcular la razón de verosimilitud (RV):

$$\text{RV +: sensibilidad} / (1 - \text{especificidad})$$

$$\text{RV -: } (1 - \text{sensibilidad}) / \text{especificidad}$$

Cuadro 7. Interpretación general de de los valores absolutos de las razones de verosimilitud positiva y negativa.

Valor	Interpretación	Valor
RV+		RV-
> 10	Excelente	< 0.1
5 - 10	Buena	0.1 - 0.2
2 - 5	Regular	0.2 – 0.5
1 – 2	Pobre	0.5 -1

(Aznar-Oroval *et al.*, 2013).

Las RV son importantes en la expresión del teorema de Bayes, para relacionar probabilidades condicionales, es decir, la probabilidad pre-test (odds pre-test) para la estimación de la probabilidad post-test (odds post-test). Donde la probabilidad pre-test, es la probabilidad de que un paciente este enfermo en la población previo al empleo de la prueba diagnóstica. La probabilidad post-test es la probabilidad de que el paciente este enfermo después de aplicada la prueba diagnóstica. También se miden las probabilidades de una enfermedad antes y después de realizar la prueba diagnóstica (Probabilidad pre-test y pos-test, respectivamente) (Van Stralen *et al.*, 2009).

2.3.2.3. Fase 3: Reproducibilidad del método

La reproducibilidad es la capacidad de un método para coincidir con los mismos resultados en pruebas repetidas con las mismas muestras obtenidos en distintos laboratorios en diferentes regiones o países empleando el mismo protocolo, un equipo similar (preferiblemente el mismo), los mismos reactivos, mismos controles y el mismo grupo de muestras. En teoría, el grupo de muestras mínimas son 20, algunas deben estar por cuadruplicado, además de que algunas se encuentren cercanas a los valores de corte. Estas estimaciones de reproducibilidad aumentan por las réplicas la repetibilidad intralaboratorio, lo cual ayuda a complementar la parte analítica (TDR, 2010; OIE, 2018).

2.3.2.4. Fase 4: Implementación del método

Hay muchos factores que influyen en la utilidad del método al ser validado, como, si es aceptada o no por parte de la comunidad científica y reguladora y por el cliente potencial. Otro factor, es su viabilidad, es decir, si los laboratorios destinados tienen la disposición de equipo o recursos para llevarla a cabo. Además, se debe tomar en cuenta ciertos requisitos de funcionamiento, como el costo, nivel de complejidad del método, la capacidad de interpretación, la disposición rápida de reactivos, el período de validez, la bioseguridad, el rendimiento de la muestra y del método y el tiempo necesario para la entrega de resultados (Crowther *et al.*, 2006; TDR, 2010; OIE, 2018).

III. JUSTIFICACIÓN

La FMMR es una enfermedad que se considera reemergente ya que se han reportado nuevos casos en los últimos años en México y otras partes del continente americano con alta tasa de mortalidad. Esto se debe a que la FMMR es una enfermedad de curso agudo, que en su etapa inicial tiene signos y síntomas son muy inespecíficos y se pueden confundir con otras enfermedades, por lo que es importante un diagnóstico rápido y confiable. En este trabajo se hace la validación de la técnica LAMP para *R. rickettsii*, como una nueva técnica de diagnóstico para FMMR, la cual presenta grandes ventajas sobre la prueba estándar de oro (Inmunofluorescencia indirecta por anticuerpos), pruebas moleculares (PCR), así como otras técnicas convencionales utilizadas a lo largo de los años. LAMP es altamente sensible comparada con las técnicas serológicas, inmunohistopatológicas y la PCR, donde la sensibilidad de estas pruebas va del 47 - 94%, además no presenta reacción cruzada con otras especies de rickettsias e infecciones como se observa en las pruebas serológicas y algunas PCR's. Se puede utilizar durante la fase aguda, ya que identifica al agente etiológico (*R. rickettsii*), y no anticuerpos como las pruebas serológicas, los cuales son detectables de 5 - 10 días después de la infección. El diagnóstico se puede realizar en biopsias de piel y muestras de sangre, asimismo, en muestras de pacientes que fueron sometidos a tratamiento con antibióticos, ya que posee alta eficiencia de amplificación. Sin embargo, la PCR es poco eficiente en muestras de sangre en la fase aguda, debido al comportamiento de la bacteria, ya que esta presenta tropismo por el tejido endotelial y puede encontrarse en bajas cantidades en la sangre. Además, LAMP no requiere de equipos especializados ni caros, ya que se realiza bajo condiciones isotérmicas (65° C), por lo que se puede utilizar en un baño maría. Otras ventajas importantes de esta técnica es que el resultado se obtiene en poco tiempo y se interpreta visualmente por cambio de color.

Por tanto, LAMP presenta todas las características que valida un método de diagnóstico. Y puede ser utilizado en la etapa aguda de FMMR, donde de la precisión y velocidad del diagnóstico son cruciales para la toma de decisiones.

IV. HIPÓTESIS

La técnica de LAMP para *Rickettsia rickettsii* es específica, sensible, reproducible y transferible.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Validar la técnica de LAMP de *Rickettsia rickettsii* en garrapatas y humanos infectados.

5.2 Objetivos específicos

- Estimar la sensibilidad diagnóstica y la especificidad diagnóstica de la técnica LAMP para *Rickettsia rickettsii*.
- Verificar la reproducibilidad de la técnica LAMP para *Rickettsia rickettsii*.
- Transferir la técnica de LAMP para *Rickettsia rickettsii* a laboratorios de diagnóstico en Salud Humana y Salud Animal.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Estandarización de la reacción de LAMP

La técnica fue estandarizada utilizando DNA extraído del antígeno de *Rickettsia rickettsii* de saco vitelino para la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta, obtenido del CDC (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades) con número de lote: 13-0019. El volumen y las concentraciones de la reacción de LAMP se obtuvieron del procedimiento ya descrito en el laboratorio de Inmunología y Vacunas (LINVAS) de la Facultad de Ciencias Naturales (FCN), Campus Aeropuerto (CA) de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) (Carvajal *et al.*, 2020), así como las indicaciones del fabricante de la enzima *Bst* DNA Polymerase, Large Fragment de New England Biolabs® inc.

La mezcla se colocó en el termociclador (Bio-Rad®) a condiciones de 63 °C durante 60 min y 85 °C por 5 min. Los productos de LAMP fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa al 1% a un voltaje de 60v por 40 minutos. Se mezclaron 15 µl del producto de LAMP con 3 µl de Buffer de carga 6x que contenía 0.5% de GelRed®. El gel fue visualizado en un fotodocumentador (Bio-Rad®). La evaluación mediante la visualización con el colorante HNB solo se observó el cambio de color de magenta a azul cielo al salir del terminar la corrida.

6.2 Preparación de alícuotas de la reacción de LAMP

Una vez estandarizada la técnica se realizaron 500 alícuotas de la mezcla de la reacción, por lotes de 100. Estas alícuotas se prepararon en mezclas de 10 reacciones y posteriormente se colocó un volumen final de 24 µl para una reacción en tubos para PCR de 200 µl, quedando listas para sólo agregar 1 µl de DNA problema (concentración de DNA por reacción > a 50 ng/µl). Se identificaron con números consecutivos del 1 al 100 por lotes, se colocaron en bolsas que cierran herméticamente y se mantuvieron a -20 °C, hasta su uso. Este paso se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Naturales Campus

Juriquilla de la UAQ. Se tomaron alícuotas al azar para realizar la reacción de LAMP y evaluar si no había contaminación de éstas. Para esto, se hicieron blancos con agua grado biología molecular, estéril, libre de nucleasas y pirógenos, la cual se utilizó como control negativo. Posteriormente en el laboratorio de Inmunología y Vacunas de CA-FCN-UAQ se realizó la reacción con el control positivo, a la par con el control negativo, para ver si el funcionamiento de las alícuotas.

El colorante HNB se preparó al momento de realizar la mezcla, al igual que la betaína.

6.3 Obtención de las muestras

Se obtuvieron un total de 133 muestras de DNA de humanos y garrapatas. Las muestras fueron diagnosticadas como positivas o negativas previamente con la técnica de PCR para la detección de *Rickettsia rickettsii*. 77 muestras de Humanos fueron obtenidas de la Unidad de Investigación de Enfermedades Infecciosas del Centro Médico Nacional Siglo XXI de la Ciudad de México (UIMEIP-CMNSXXI). Asimismo, se obtuvieron 56 muestras de DNA del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California (IICV-UABC), de las cuales 30 muestras son de garrapatas y 26 corresponden a Humanos.

6.4 Evaluación de las muestras con el método LAMP

Se realizó un estudio en ciego donde se evaluaron las muestras de DNA de humano y de garrapata con la técnica de LAMP. 77 muestras de DNA de humanos se evaluaron en el Laboratorio de la UIMEIP-CMNSXXI. 26 muestras de DNA de garrapatas y 30 muestras de DNA de humanos se evaluaron en el IICV-UABC. Se siguió el mismo protocolo, se realizó con los mismos reactivos y se utilizaron los mismos controles en ambos casos. En la UIMEIP-CMNSXXI se utilizó una campana de acrílico con luz UV, uso exclusivo para la técnica de LAMP, el termociclador utilizado fue de la marca Eppendorf. Los productos obtenidos se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % a un voltaje de 50v por 40 minutos. Se mezclaron 5 µl del producto de LAMP con 1 µl de Buffer de carga 6x que contenía

0.5% de GelRed®. El gel fue visualizado en un fotodocumentador. También se realizó la evaluación visual de los productos mediante el cambio de color magenta a azul cielo al salir del termociclador, los resultados fueron anotados para su análisis. En el IICV-UABC, se realizó la técnica en una campana con luz UV, en un área exclusiva para colocar las muestras de DNA problema. En una segunda área se colocó el control positivo (área exclusiva para controles positivos), se utilizó igualmente un termociclador y se evaluaron por electroforesis como fue descrito anteriormente.

Para evaluar la repetibilidad en el Laboratorio de la UIMEIP-CMNSXXI, al siguiente día se tomaron 6 muestras al azar que ya habían resultado positivas mediante la técnica de LAMP. Se realizó de nuevo la prueba, utilizando el mismo protocolo, los mismos reactivos y equipo.

6.5 Determinación de Especificidad y Sensibilidad diagnóstica

Los resultados obtenidos se colocaron en cuadro 2x2. Donde la sensibilidad es: $[\text{verdadero positivo} / (\text{verdadero positivo} + \text{falso negativo})]$, y la especificidad es: $[\text{verdadero negativo} / (\text{negativo verdadero} + \text{falso positivo})]$. Esto se realizó para obtener los valores de Especificidad y Sensibilidad del método LAMP. También se estimaron los valores predictivos tanto positivos como negativos, y el grado de concordancia mediante el índice Kappa, los cocientes de probabilidad, así como la exactitud de nuevo método. Estos valores se determinaron manualmente con las formulas que indica la literatura y por medio de programas como: Diagnostic Test Calculator <http://araw.mede.uic.edu/cgi-bin/testcalc.pl>; MEDCALC easy-to-use statistical software <https://www.medcalc.org/index.php>.

6.6 Evaluación de la reproducibilidad

Un estudio parcial de la reproducibilidad se realizó, las muestras obtenidas en los dos laboratorios se trabajaron en ciego. Además, los reactivos y los controles, así como el protocolo en que fueron evaluadas eran el mismo. También, parte de

esas muestras fueron evaluadas en el laboratorio de Inmunología y vacunas de la UAQ. En el caso de las muestras provenientes de el IICV-UABC, se evaluaron todas (de humanos y garrapatas).

Los resultados obtenidos se compararon, además se obtuvieron datos como: disponibilidad de equipo, capacidad de interpretación, rendimiento de la prueba, tiempo necesario para la entrega de resultados y la viabilidad de la prueba para realizarse en sus laboratorios.

6.7 Transferencia de tecnología

La viabilidad de la técnica de LAMP se realizó en cada uno de los laboratorios donde se obtuvieron las muestras de DNA para el presente estudio. En ambos laboratorios (UIMEIP-CMNSXXI y IICV-UABC) se realizó la técnica de acuerdo con las condiciones que presentaba cada uno, como el diseño del laboratorio, la marca del termociclador, el equipo para la visualización del gel de agarosa, así como el personal técnico. En el caso del laboratorio de la UIMEIP-CMNSXXI, se le enseñó al técnico las bases del método y su realización, además de como interpretar los resultados obtenidos tanto en la colorimétrica como en el gel agarosa.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Estandarización del método de LAMP y preparación de las alícuotas de la reacción

Como se menciona en la metodología, se realizaron varias reacciones para poner a punto el método, tanto en electroforesis como en colorimetría, hasta obtener el grado de repetibilidad (OIE, 2018), y para esto se utilizaron únicamente los controles positivo y negativo. En la figura 12, se muestran los productos de la reacción de LAMP para *Rickettsia rickettsii*. En el panel A se observa mediante electroforesis en gel agarosa, el control positivo con un barrido uniforme como lo menciona Notomi *et al.*, 2000. En el panel B se visualiza, mediante colorimetría, el cambio de color de magenta a azul cielo, negativo y positivo, respectivamente (Goto *et al.*, 2009).

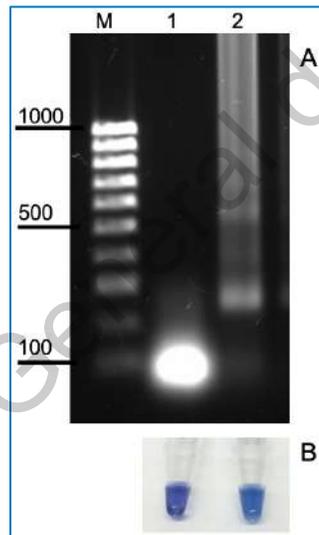


Figura 12. Reacción de LAMP para *Rickettsia rickettsii*.

M: marcador de talla molecular (100pb); 1: control negativo; 2: control positivo. A: electroforesis en gel agarosa; B: colorimetría por HNB.

Debido a que la reacción de LAMP es muy sensible se puede contaminar con gran facilidad. Una cantidad mínima de DNA blanco puede ser la causa de la contaminación, así como puntas, tubos no estériles, áreas de trabajo y equipos contaminados, llegando a dar resultados falsos positivos (Tomita *et al.*, 2008). Para evitar este problema las alícuotas de la reacción y las pruebas con el control positivo y muestras se realizaron en dos laboratorios diferentes como se mencionó en la

metodología, con todas las medidas preventivas y cuidado, como lo menciona Hsieh *et al.*, 2014. Una vez que ocurre la contaminación, el proceso de descontaminación requiere mucho tiempo y dinero, ya que todos los reactivos son reemplazados, las áreas de trabajo y el equipo deben descontaminarse adecuadamente (Tanner & Evans, 2014).

En la figura 13 se observan los resultados de la reacción de LAMP utilizando solo blancos negativos para corroborar que no haya contaminación de las alícuotas preparadas. Tanto, en el gel agarosa (panel A), y en la colorimetría (panel B) no se observan cambios que nos indiquen contaminación, como el barrido característico de la reacción o cambio de color magenta a azul cielo, respectivamente, este proceso se realizó en el laboratorio de Microbiología. Por otro lado, en el laboratorio de Inmunología y Vacunas se realizó la prueba con el control positivo y negativo a la par. En la figura 13 observamos que el control negativo, no tiene amplificación, como se esperaba. Por su parte, los controles positivos amplificaron, ya que se observa el barrido en el gel (panel C) y el cambio de color.

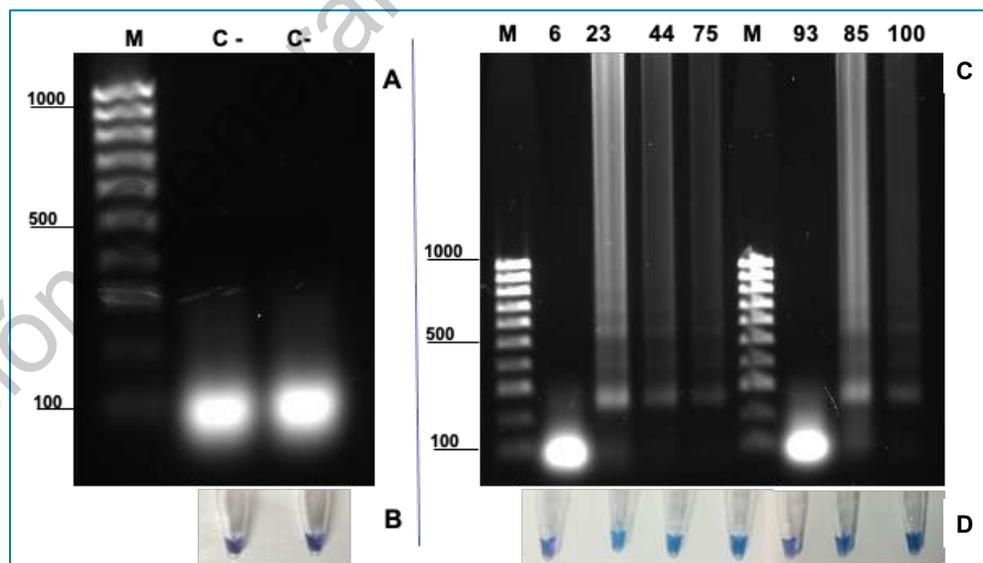


Figura 13. Evaluación de las alícuotas para la reacción de LAMP. 1.Reacción de LAMP con blancos negativos. A: electroforesis en gel agarosa (M: marcador de talla molecular (100pb); C- :control negativo); B: colorimetría por HNB. (M: marcador de talla molecular (100pb); 6 y 93: controles negativos; 23, 44 ,75, 85 y 100: control positivo); C: electroforesis en gel agarosa; D: colorimetría por HNB.

7.2 Determinación de los indicadores de diagnóstico del método de LAMP

Se obtuvieron muestras clínicas que fueron positivas y muestras que fueron negativas, previamente evaluadas con una prueba diagnóstica para ácidos nucleicos, PCR punto final para humanos y PCR anidado para garrapatas. El tamaño de muestra se eligió de acuerdo a los valores probables de sensibilidad y de especificidad diagnóstica de nuestra prueba, el error permitido y del nivel de confianza que deseamos basándonos en el cuadro 5, obtenido del Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de la OIE (2018). Para las muestras de humanos se evaluó un total de 103 para un error del 5% y una confianza del 95% con una especificidad del 95% y una sensibilidad esperada del 98%. Las muestras fueron del laboratorio de la UIMEIP-CMNSXXI (positivas y negativas) y del laboratorio del IICV-UABC (positivas y negativas). Para el tamaño de muestra de garrapatas sólo se obtuvieron del laboratorio del IICV-UABC y fueron un total de 30 muestras (15 positivas y 15 negativas) para un error del 5 % y una confianza del 95% con una especificidad y sensibilidad esperada del 99 %, para ambas.

Como ya se mencionó anteriormente estas muestras se evaluaron en ciego en cada uno de los laboratorios colaboradores. Al término del ciclo se realizó la valoración de la colorimetría de cada una de ellas y posteriormente se hizo la electroforesis de esos productos para checar la concordancia entre los resultados colorimétricos y el gel de agarosa como se observa en la figura 14.

Además, en el laboratorio de la UIMEIP-CMNSXXI se realizó una prueba para saber si había repetibilidad de los resultados ya obtenidos por la reacción de LAMP, donde se tomaron al azar 5 muestras positivas y se evaluaron nuevamente, los resultados concordaron con los ya obtenidos, como se puede apreciar en la figura 15.

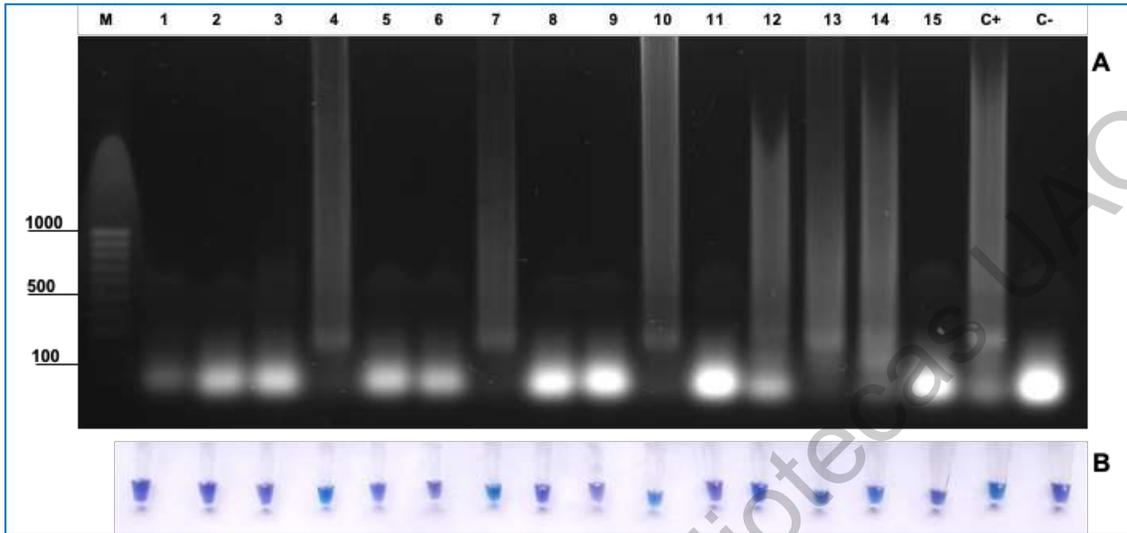


Figura 14. Reacción de LAMP con muestras de campo del laboratorio de la UIMEIP-CMNSXXI. M: marcador de talla molecular (100pb); C+: control positivo; C-: control negativo; A: electroforesis en gel agarosa; B: colorimetría por HNB. 1-15 muestras de campo.

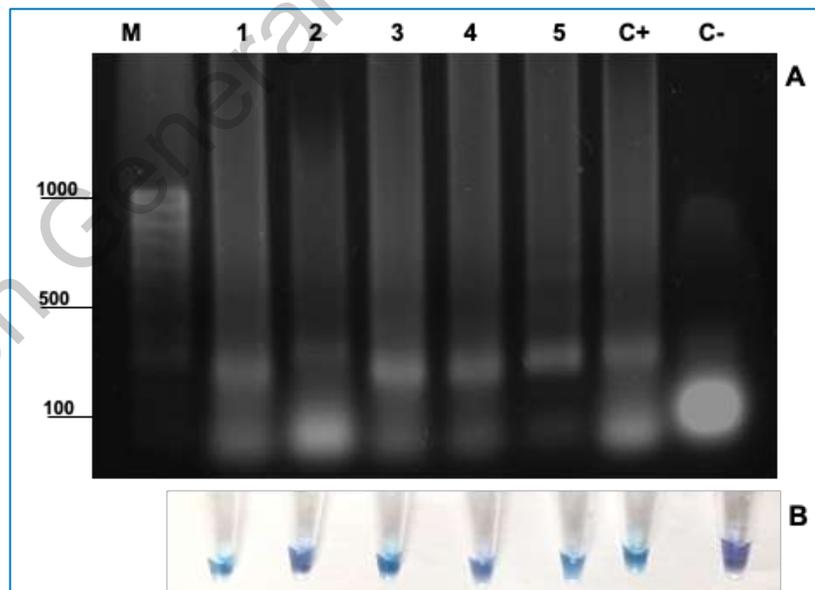


Figura 15. Repetibilidad de resultados de la reacción de LAMP en el laboratorio de la UIMEIP-CMNSXXI. M: marcador de talla molecular (100pb); C+: control positivo; C-: control negativo; A: electroforesis en gel agarosa; B: colorimetría por HNB. 1-6 muestras de campo previamente confirmadas como positivas.

Los resultados obtenidos de la evaluación en ciego de todas las muestras se acomodaron en una tabla de contingencia de 2x2 (Staquet et al., 1981; Ghaaliq & McCluskey, 2008; Schoonjans, 2020), para su análisis (cuadro 8).

Cuadro 8. Resultados obtenidos por la técnica de LAMP y PCR en muestras clínicas de humanos y garrapatas y su nivel de concordancia.

	PCR			Exactitud (%)	IC 95%	kappa (k)	IC 95%
	Positivo	Negativo	Total				
HUMANOS							
LAMP-HNB							
Positivo	28	22	50	77	67.3 - 84.5	0.53	0.35 - 0.70
Negativo	2	51	53				
Total	30	73	103				
LAMP-Electroforesis							
Positivo	29	31	60	69	59 - 77.7	0.42	0.26 - 0.58
Negativo	1	42	43				
Total	30	73	103				
GARRAPATAS							
LAMP-HNB							
Positivo	12	1	13	86.7	69.3 96.2	0.73	0.38 - 1
Negativo	3	14	17				
Total	15	15	30				
LAMP-Electroforesis							
Positivo	13	2	15	86.7	69.3 96.2	0.73	0.38 - 1
Negativo	2	13	15				
Total	15	15	30				

IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

En el cuadro 8 se encuentran los valores positivos, negativos, falsos positivos, falsos negativos, así como, las concordancias obtenidas al comparar las técnicas de PCR y LAMP (HNB y electroforesis). En las muestras clínicas de humanos se observan para LAMP-HNB 28 muestras positivas y 51 negativas con una exactitud del 77% (IC 95%: 67.3 - 84.5%) y un índice kappa del 0.53 (IC 95%: 0.35 - 0.70%); con 22 falsos positivos y 2 falsos negativos. Para LAMP-electroforesis se observa una exactitud del 69% (IC 95%: 59 - 77.7%), un índice kappa de 0.42

(IC 95%: 0.26 - 0.58%), con 29 muestras positivas, 42 muestras negativas, 31 falsos positivos y 1 falso negativo.

En muestras de garrapatas se obtuvo en LAMP-HNB, 12 muestras positivas, 14 fueron negativas, 1 falso positivo y 3 falsos negativos. En cuanto, LAMP-electroforesis hubo 13 muestras positivas y 13 negativas, 2 falsos positivos y 2 falsos negativos, el valor de la exactitud fue de 86.7% (IC 95%: 69.3 - 96.2%) tanto en HNB, como en electroforesis, al igual que el $k = 0.73$ (IC 95%: 0.38 - 1%) para ambas.

Por lo tanto, la concordancia obtenida en exactitud e índice kappa, en HNB y electroforesis para muestras clínicas de humanos fue moderada de acuerdo al criterio de evaluación establecido por Landis & Koch en 1977. Sin embargo, en lo que se refiere a los resultados obtenidos de la evaluación de garrapatas el nivel de concordancia es bueno para HNB y electroforesis. Cabe resaltar que la discrepancia en el grado de concordancia entre las muestras clínicas de humanos y garrapatas se puede deber a que la técnica utilizada para las muestras clínicas de humanos fue un PCR punto final y para las muestras de garrapatas fue un PCR anidado, el cual es más sensible y específico que el PCR punto final (Loeffelholz & Deng, 2006), por lo cual hay mejor grado de concordancia con nuestro método de LAMP.

Por otro lado, se estimó la concordancia que hay entre la colorimetría y la electroforesis de la prueba de LAMP, tanto para muestras de humanos y de garrapatas, los resultados fueron $k = 0.82$ (IC del 95%: 0.63 - 1) y $k = 0.87$ (IC del 95%: 0.51 - 1) respectivamente, lo cual indica que tienen muy buena concordancia entre ellas (Landis & Koch en 1977).

El análisis de los indicadores de desempeño de diagnóstico fueron estimados usando la información del cuadro 9. Primero se calcularon en una tabla de Excel y posteriormente se verificaron con ayuda de los programas Diagnostic Test Calculator <http://araw.mede.uic.edu/cgi-bin/testcalc.pl> y MEDCALC easy-to-use statistical software <https://www.medcalc.org/index.php>. Se observó que los resultados coinciden (Cuadro 9 y 10).

Cuadro 9. Indicadores de desempeño diagnóstico del método de LAMP para muestras clínicas de humanos.

	HNB	IC 95%	Electroforesis	IC 95%
Sensibilidad	93%	77.9 – 99.2	97%	82.7 – 99.9
Especificidad	70%	58.62 - 80.03	58%	45.4 - 69
VPP	56%	46.98- 64.64	48%	41.5 – 55.2
VPN	96%	86.9 - 98.9	98%	55.8 – 99.7
RV+	3.1	2.16 - 4.45	2.28	1.73 - 3.0
RV -	0.1	0.02 - 0.37	0.06	0.01 -0.4
Odds pre-test	0.42		0.41	
Odds pos-test (+)	1.3		0.9	
Probabilidad pos-test (+)	56%	46 - 64	48%	42 - 55
Odds pos-test (-)	0.0		0.0	
Probabilidad pos-test (-)	4%	1 - 13	2%	0 - 14

VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo, RV+: razón de verosimilitud positiva, RV-: razón de verosimilitud negativa, Odds: probabilidad. IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

En cuanto al desempeño diagnóstico de nuestro método de LAMP al compararlo con la técnica de referencia encontramos en las muestras clínicas de humanos en LAMP-HNB una sensibilidad del 93% (IC 95%: 71.03 - 96.49%), una especificidad del 70% (IC 95%: 58.62 - 80.03%). En LAMP-electroforesis la sensibilidad determinada fue del 97% (IC 95%: 82.7 – 99.9%) y una especificidad del 58% (IC 95%: 45.4 – 69%). Observamos que las estimaciones con los parámetros usados (sensibilidad 98%, especificidad 95%, con una confianza del 95% y error del 5%) no son las esperadas en HNB ni en electroforesis. En el caso de la sensibilidad la diferencia es poca, pero la especificidad es muy inferior a la estimada. Sin embargo, para poder lograr los valores esperados se volvió a examinar el cuadro 4 (OIE, 2018), lo cual determina que se debe aumentar el número de muestras para ambos indicadores.

Las razones de verosimilitud que indica cuánto es más probable obtener un determinado resultado (positivo o negativo) encontramos que en LAMP-HNB, fue de 3.1 (IC 95%: 2.16 - 4.45) para RV+ y RV- fue de 0.1 (IC 95%: 0.02 - 0.37); en LAMP-electroforesis la RV+ fue de 2.28 (IC 95%: 1.73 - 3.0) y 0.06 (IC 95%: 0.01 -

0.4) para RV-. Por lo tanto, las RV+ de ambas se consideran bajas y las RV-son excelentes de acuerdo al cuadro 7 (Aznar-Oroval *et al.*, 2013). Lo que demuestra que en el caso de RV- un resultado negativo puede descartar la infección por *R. rickettsii* con una confianza alta, no así, en el caso de RV + que se debe confirmar el resultado. El mismo fenómeno se observa con los valores predictivos positivo y negativos (cuadro 9).

Por otro lado, también se evaluaron las probabilidades post-test positiva y negativa. Que es la probabilidad de que un paciente este o no enfermo después de aplicar la prueba diagnóstica (Van Stralen *et al.*, 2009). Para LAMP-HNB la probabilidad pos-test positiva fue de 56% (IC 95%: 46 – 64%), y 4% (IC 95%: 1 – 13%) para la negativa. La probabilidad del 48% (IC 95%: 42 – 55%) y 2% (IC 95%: 0- 14%) positiva y negativa, respectivamente fueron para LAMP-electroforesis. Por lo tanto, 1 en 1.8 con diagnóstico positivo están enfermos y 1 en 1 con diagnóstico negativo están sanos en el caso de LAMP-HNB. En el caso de LAMP-electroforesis 1 en 2.1 con diagnóstico positivo están enfermos y 1 en 1 con diagnóstico negativo están sanos (Douglas, 1991; Schwartz, 2006).

Cuadro 10. Indicadores de diagnóstico del método de LAMP para muestras de garrapatas.

	HNB	IC 95%	Electroforesis	IC 95%
Sensibilidad	80%	51.9 – 95.67	87%	59.5 – 98.3
Especificidad	93%	68 – 99.83	87%	59.5 – 98.3
VPP	92%	63.9 – 98.8	87%	63.8 - 96
VPN	82%	62.7 – 92.8	87%	63.8 - 96
RV+	12	1.78 - 81	6.52	1.76 - 24
RV-	0.2	0.08 - 0.59	0.15	0.04 - 0.57
Odds pre-test	1		1	
Odds pos-test (+)	12		6.52	
Probabilidad pos-test (+)	92%* ¹	64 - 99	87%** ¹	64 - 96
Odds pos-test (-)	0.2		0.1	
Probabilidad pos-test (-)	17%** ²	7 - 37	13%** ²	4 - 36

VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo, RV+: razón de verosimilitud positiva, RV-: razón de verosimilitud negativa, Odds: probabilidad. IC 95%: intervalo de confianza del 95.

Asimismo, se realizó el análisis de los indicadores de desempeño diagnóstico de LAMP para de las muestras de garrapatas como se observa en el cuadro 11. La sensibilidad para LAMP-HNB fue del 80% (IC 95%: 51.9 – 95.67%), con una especificidad del 93% (IC 95%: 68 – 99.83%), una RV + de 12 (IC 95%: 1.78 - 81) y una RV- de 0.2 (IC95%: 0.08 - 0.59). En LAMP-electroforesis la sensibilidad y especificidad fueron del 87% (IC 95%: 59.5 – 98.3%), para ambas, las razones de verosimilitud fueron de 6.52 (IC 95%: 1.76 - 24) para RV+ y 0.15 (IC 95%: 0.04 - 0.57) para RV-. Por lo tanto, las estimaciones esperadas para sensibilidad y especificidad fueron del 99%, con una confianza del 95% y un error del 5%, las cuales no se acercan a las obtenidas en HNB y en electroforesis. Para ambos casos los valores obtenidos son muy inferiores a los estimados. Sin embargo, se requiere aumentar el número de muestras (cuadro 4). Por otro lado, la RV+ de LAMP-HNB se considera excelente (>10) y buena (5-10) para LAMP-electroforesis. Las RV- de ambas son buenas (0.1 – 0.2) (cuadro 7). Entonces, de acuerdo a los resultados obtenidos ambas tienen la capacidad para poder confirmar o descartar en caso de sospecha de la infección con el agente, con alta confianza.

También se evaluaron las probabilidades post-test positiva y negativa. Para LAMP-HNB la probabilidad pos-test positiva fue de 92% (IC 95%: 64 - 99%), y 17% (IC 95%: 7 - 37%) para la negativa. La probabilidad para LAMP-electroforesis fue del 87% (IC 95%: 64 - 96%) y del 13% (IC 95%: 4 - 36%) positiva y negativa, respectivamente. Por lo tanto, se dice que en el caso de LAMP-HNB 1 en 1.1 con diagnóstico positivo están enfermos, 1 en 1.2 con diagnóstico negativo están sanos. En el caso de LAMP-electroforesis 1 en 1.2 con diagnóstico positivo están enfermos, 1 en 1.2 con diagnóstico negativo están sanos (Douglas, 1991; Schwartz, 2006).

Cuando se evalúa una prueba diagnóstica, es fundamental conocer y saber interpretar sus propiedades intrínsecas (sensibilidad y especificidad). Saber que los valores predictivos y los valores de probabilidades son mejores indicadores en la práctica, debido a que determinan el grado de utilidad del método para el

diagnóstico y permiten la toma de decisiones (Trevetan, 2017). Estas características son importantes, y en algunas ocasiones dependen si se requieren pruebas más sensibles o más específicas. Es decir, una prueba diagnóstica para screening o tamizaje es muy sensible, lo que permite que se considere con seguridad que las personas no tienen una afección si su prueba da un resultado negativo. Por el lado contrario, una prueba para confirmar un diagnóstico debe tener alta especificidad, para tratar de reducir el riesgo de clasificar como enfermo a un sano (Ochoa y Orejas 1999).

7.3 Características operativas de la validación del método de LAMP

Una prueba diagnóstica perfecta es la que siempre da resultados positivos en pacientes enfermos y negativos en sanos. Sin embargo, en la práctica es raro encontrar un estándar con una sensibilidad y especificidad del 100% y esto puede dar estimaciones incorrectas al compararla con la nueva técnica. Para elegir una nueva técnica diagnóstica además de sus características intrínsecas debe ofrecer algunas ventajas más sobre las anteriores que respalden su aplicación. Dichas ventajas podrían ser obtener resultados en un menor tiempo, una aplicación más sencilla, un reducido costo, ser más accesibles, ser poco invasivas y peligrosas, la aceptación del usuario y sobre todo poder transferir la tecnología (Trevetan, 2017). También, se debe considerar el curso de la enfermedad, si es grave, asintomática o contagiosa. Por lo tanto, un diagnóstico rápido puede ayudar al inicio de un tratamiento, especialmente si el curso de la enfermedad así lo requiere y se puede tratar de manera efectiva disminuyendo el riesgo de ésta (TRD, 2010).

En lo que se refiere al costo de la reacción de LAMP fue de \$ 44.01 pesos M.N. para un volumen final de 25 μ l. Cabe mencionar que sólo se consideraron los reactivos utilizados para la realización de la técnica de LAMP con precios actuales del año 2020 (cuadro 11).

Cuadro 11. Cálculo del costo por reacción del método de LAMP para *R. rickettsii*.

Reactivo	Costo/cantidad de reacciones	Costo por reacción
Oligonucleotidos (3 pares)	\$ 3832.64 / 1000	\$ 3.83
dNTPs mix (4)	\$ 3177.81 / 700	\$15.88
Betaína	\$ 512 / 1, 000,000	\$ 0. 001
HNB	\$ 7058.26 / 250, 000	\$ 0.028
Kit Bst DNA Polymerase	\$ 4, 872.25 / 200	\$ 24.36
	TOTAL	\$ 44.099

Si comparamos los costos con el PCR punto final o PCR anidado estos se elevan más, ya que en ambos se requiere el uso de un termociclador que es un equipo costoso y complejo, lo cual para el método de LAMP no es necesario ya que al ser una reacción isotérmica permite el uso de equipos no tan costosos ni especializados como un simple baño maría (Boehme *et al.*, 2007).

Además, para la visualización de resultados los PCR requieren el uso de un equipo de electroforesis y un fotodocumentador, lo cual incrementa el costo y la disponibilidad de contar con él. En el caso de LAMP, la ventaja es que se puede obtener un resultado de manera visual gracias al colorante HNB (Goto *et al.*, 2009), asimismo se puede visualizar mediante electroforesis, que de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio ambos tienen una muy buena concordancia ($k= 0.82 - 0.87$) (Landis & Koch en 1977). Estas características hacen que el método de LAMP sea simple y fácil para la interpretación de los resultados.

El tiempo requerido para la obtención de resultados también es menor a una hora, debido a que presenta los oligonucleótidos Loop que actúan en el paso de elongación acelerando la reacción y disminuyendo el tiempo de la misma (Nagamine *et al.*, 2002). En comparación con un PCR punto final o un PCR anidado, se observa una disminución de tiempo desde una hora o 4-5 horas, respectivamente, esto sin

incluir el tiempo invertido en la toma de la muestra, en la obtención del material genético, ni en la preparación de la mezcla.

Por lo tanto, estos resultados indican que la utilidad del método de LAMP en el diagnóstico es considerable, dado que el tiempo para obtener resultados y los costos son menores que los de las pruebas de PCR, ya que la utilidad de éstos está limitada por su costo y complejidad, particularmente en lugares donde no hay disponibilidad de recursos, además que es un método factible de implementar en otros laboratorios como se demostró en las estancias realizadas en la UIMEIP-CMNSXXI y en el IICV-UABC en octubre y noviembre del 2009.

VIII. CONCLUSIONES

La prueba de LAMP para *R. rickettsii* evaluada en este estudio ofrece ventajas comparativas respecto a los estándares de referencia utilizados. Estas ventajas son el bajo costo de la prueba, la obtención de resultados en menos tiempo, así como su interpretación mediante la visualización colorimétrica (HNB), además de que se puede hacer mediante electroforesis, que como ya se mencionó presentan un grado de concordancia alto, es más sencilla de hacer, accesible y sobre todo no requiere equipo especializado.

En cuanto a los indicadores de rendimiento por una parte presenta una alta sensibilidad y moderada especificidad y por otra presenta una alta especificidad y moderada sensibilidad, esto se debe a que los estándares de referencia utilizados no son perfectos y no son los mismos, en el primer caso es un PCR punto final y en el segundo es un PCR anidado, lo que sub o sobre estiman los indicadores de la nueva técnica. Como puede ser una prueba rápida dirigida a la identificación temprana de humanos infectados con *Rickettsia rickettsii*, ya que esta enfermedad presenta una mortalidad elevada, la cual se encuentra muchas veces relacionada con la demora en el diagnóstico y por consecuencia el retraso en el tratamiento, considerando esta característica como una ventaja adicional en el diagnóstico, tratamiento y resultado del paciente.

Con todo lo anterior, la técnica de LAMP cumple con muchos de los requisitos de un método de diagnóstico adecuado de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud, que son bajo costo, simplicidad, rapidez; robustez y fácil disponibilidad de instrumentos y equipos (Li *et al.*, 2017).

IX. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez-Hernández, G., González, J., Hernández, N., Lash, R., Barton, C., & Paddock, C. (Jun, 2017). Rocky Mountain spotted fever in Mexico: past, present, and future. *Lancet Infect Dis*, 17, e189-e196.

Anderson, J. (1903). *Spotted fever (tick fever) of the Rocky Mountains*. U. S. Pub. Health and Marine Hosp. Service, Hyg., Lab Bull.

Anderson, J., & Magnarelli, L. (2008). Biology of Ticks. *Infect Dis Clin N Am*, 22, 195–215.

Aznar-Oroval, E., Mancheno, A., García-Lozano, T., & Sánchez-Yepes, M. (2013). Likelihood ratio and Fagan's nomogram: 2 basic tools for the rational use of clinical laboratory tests. *Rev Calid Asist*, 390-393.

Beati, L., Nava, S., Burkman, E., Barros-Battesti, D., Labruna, M., Guglielmone, A., Faccini, J. (2013). *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evol Biol*, 13, 1-20.

Benotson, I. (1947). Classification of the Rickettsiae of Rocky Mountain Spotted Fever and of Endemic (Murine) Typhus. *J Bacteriol*, 53(3), 325-327.

Biggs, H., Behravesh, C., Bradley, K., Dahlgren, F., Drexler, N., Dumler, J., . . . Traeger, M. (May de 2016). *Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever and Other Spotted Fever Group Rickettsioses, Ehrlichioses, and Anaplasmosis — United States*. Centers for Diseases Control and Prevention, US Department of Health and Human Services. Atlanta, GA: MMWR.

Boehme, C. C., Nabeta, P., Henostroza, G., Raqib, R., Rahim, Z., Gerhardt, M., . . . Perkins, M. (2007). Operational Feasibility of Using Loop-Mediated Isothermal Amplification for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Microscopy Centers of Developing Countries. *J. CLIN. MICROBIOL.*, 1936-1940.

Brumpt, E. (1922). *Précis de parasitologie. Masson et Cie.*

Bustamante, M., & Varela, G. (1943). Una nueva rickettsiosis en México. Existencia de la fiebre manchada Americana en los estados de Sinaloa y Sonora. . *Rev Inst Salub Enferms Trop*, 4, 189–211.

CDC. (2009). *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories (BMBL)*. National Institutes of Health, US Department of Health and Human Services, CDC, Washington, DC.

Clements, M., Dumler, J., Fiset, P., Wisseman, C., Snyder, M., & Levine, M. (Nov 1983). Serodiagnosis of Rocky Mountain Spotted Fever: Comparison of IgM and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Indirect Fluorescent Antibody Test. *J Infect Dis*, 148(5), 876-880.

Cooley, R., & Kohls, G. (1944). The Genus *Amblyomma* (Ixodidae) in the United States. *J Parasitol*, 30, 77-111.

Cox, R. (23 de December de 1938). Use of Yolk Sac of Developing Chick Embryo as Medium for Growing Rickettsiae of Rocky Mountain Spotted Fever and Typhus Groups. *Public Health Rep*, 53(51), 2241-2247.

Crowther, J., Unger, H., & Viljoen, G. (2006). Aspects of kit validation for tests used for the diagnosis and surveillance of livestock diseases: producer and end-user responsibilities. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 25(2), 913-935.

Dantas-Torres, F. (01 de November de 2007). Review: Rocky Mountain Spotted Fever. *Lancet Infect Dis*, 7(11), 724-732.

Dantas-Torres, F. (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control . *Vet Parasitol*, 152, 173-185.

Demma, L., Traeger, M., Nicholson, W., Paddock, C., Blau, D., Eremeeva, M., . . . McQuiston, J. (2005). Rocky Mountain Spotted Fever from an Unexpected Tick Vector in Arizona. *N Engl J Med*, 35(3), 587-594.

Diamon, A. (1992). Clinical Epistemology of Sensitivity and Specificity. *J Clin Epidemiol*, 9-13.

Douglas, C. (1993). Evaluating Diagnostic Test. *Adv Dent Res*, 66-69.

Douglas, G. (1991). *Practical statistics for medical research*. London: Chapman and Hall.

Drexler, N., Yaglom, H., Casal, M., Fierro, M., Kriner, P., Murphy, B., . . . Paddock, C. (Oct de 2017). Fatal Rocky Mountain Spotted Fever along the United States–Mexico Border, 2013–2016. *Emerg Infect Dis*, 23(10), 1621-1626.

Dumler, J., Gage, W., Pettis, G., Azad, A., & Kuhadja, F. (1990). Rapid immunoperoxidase demonstration of *Rickettsia rickettsii* in fixed cutaneous specimens from patients with Rocky Mountain spotted fever. *Am. J. Clin. Pathol.*, 93, 410–414.

Dyer, R., Badger, L., & Rumreich, A. (12 de June de 1931). Rocky Mountain Spotted Fever (Eastern Type): Transmission by the American Dog Tick (*Dermacentor variabilis*). *Public Health Rep*, 46(24), 1403-1413.

Eiken Chemical Co., Ltd. . (2005). *A guide to LAMP primer designing*. . Recuperado el 17 de Noviembre de 2018, de Eiken Genome Site: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/index.html>

Eremeeva, M., Zambrano, M., Anaya, L., Beati, L., Karpathy, S., Santos-Silva, M., . . . Alpuche, C. (2011). *Rickettsia rickettsii* in Rhipicephalus Ticks, Mexicali, Mexico . *J Med Entomol*, 48(2), 418-421 .

Fournier, P., & Raoult, D. (2009). Current Knowledge on Phylogeny and Taxonomy of *Rickettsia* spp. *Rickettsiology and Rickettsial Diseases-Fifth International Conference: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1166, págs. 1-11. New York: New York Academy of Sciences.

Fournier, P., Roux, V., & Raoult, D. (1998). Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. *Int J Syst Bacteriol*, 48, 839–849.

Ghaaliq, L., & McCluskey, A. (2008). Clinical Tests: Sensitivity and Specificity. *BJA*, 221-223.

Giménez, D. (1964). Staining *Rickettsiae* in Yolk-Sac Cultures. *Stain Technol*, 39(3), 135-140.

Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., & Hanaki. (2009). Colorimetric detection of loop mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue . *BioTechniques* , 46, 167-172.

Hattwick, M., Retailiau, H., O'Brien, R., Slutzker, M., & Fontaine, R. (1978). Fatal Rocky Mountain Spotted Fever. *JAMA*, 240(14), 1499-1503.

Hsieh, K., Mage, P., Csordas, A., Eisenstein, M., & Soh, T. (2014). Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop- mediated isothermal amplification (UDG-LAMP). *Chem Commun*, 3747.

Kaplan, J., & Schonberger, L. (1986). The Sensitivity of Various Serologic Tests in the Diagnosis of Rocky Mountain Spotted Fever. *Am J Trop Med Hyg*, 35(4), 840 - 844.

Kaplowitz, G., & Robertson, G. (1983). Hyponatremia in Rocky Mountain Spotted Fever: Role of Antidiuretic Hormone. *Ann Intern Med*, 98(3), 334-335.

Keenan, K., Buhles, W., Huxsoll, D., Williams, R., & Hildebrandt, P. (1977). Studies on the pathogenesis of *Rickettsia rickettsii* in the dog: clinical and clinicopathologic changes of experimental infection. *Am J Vet Res*, 38, 851–856.

Labruna, M., Amaku, M., Metzner, J., Pinter, A., & Ferreira, F. (2003). Larval Behavioral Diapause Regulates Life Cycle of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Southeast Brazil. *J Med Entomol*, 40(2), 170-178.

Labruna, M., Kasai, N., Ferreira, F., Faccini, J., & Gennari, S. (2002). Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Vet Parasitol*, 105, 75-77.

Landis, J., & Koch, G. (1997). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 159-174.

La Scola, B., & Raoult, D. (Nov de 1997). Laboratory Diagnosis of Rickettsioses: Current Approaches to Diagnosis of Old and New Rickettsial Diseases. *J Clin Microbiol*, 35(11), 2715–2727.

Levin, M., Killmaster, L., Zemtsova, G., Ritter, J., & Langham, G. (2014). Clinical Presentation, Convalescence, and Relapse of Rocky Mountain Spotted Fever in Dogs Experimentally Infected via Tick Bite . *Plos one*, 9(12), 1-19.

Li, Y., Fan, P., Zhou, S., & Zhang, L. (2017). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. *Microb. Pathog.*, 54-61.

Loeffelholz, M., & Deng, H. (2006). PCR and Its Variations. En Y.-W. Tang, & C. Stratton, *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* (págs. 166-183). Boston M.A: Springer.

McCalla, L. P. (1908). Direct transmission from man to man of the Rocky Mountain spotted (tick) fever. *Med Sentinel*, 16, 87-88.

Maxey, E. (1899). Some observations on the so-called spotted fever of Idaho. *Med Sentinel*, 7, 433–438.

Merhej, V., El Karkouri, K., & Raoult, D. (2009). Whole genome-based phylogenetic analysis of Rickettsiae. *Clin Microbiol Infect*, 15(2), 336–337.

Mori, Y., Kitao, M., Tomita, N., & Notomi, T. (2004). Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J Biochem Biophys Methods*, 59, 145–157.

Mori, Y., Kitao, M., Tomita, N., & Notomi, T. (2004). Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 59, 145–157.

Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., & Notomi, T. (23 de Nov de 2001). Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 289(1), 150-154.

Nagamine, K., Hase, T., & Notomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes*, 16, 223-229.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (15 de june de 2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 28(12), e63.

Nuttall, G. (1915). Observations on the biology of Ixodidae. *Parasitol*, 7, 408–456.
Oliveira, K., Pinter, A., Medina-Sanchez, A., Boppana, V., Wikel, S., Saito, T., . . . Bouyer, D. (2010). *Amblyomma imitator* ticks as vectors of *Rickettsia rickettsii*, Mexico. *Emerg Infect Dis*, 16(8), 1282-1284.

Oliveira, P., Borges, L., Lopes, C., & Leite, R. (2000). Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol*, 92, 295-301.

Oliver, J. (1989). Annual Review of Ecology and Systematics of ticks (Acari: Ixodida). *Annu Rev Ecol Sys*, 20, 397-430.

Ochoa, C., & Orejas, G. (1999). Pruebas diagnósticas. *An Esp Pediatr*, 301-314.

OIE. (2018). Validation of diagnostic tests. En OIE, *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (págs. 196-237).

Parola, P., & Raoult, D. (15 de Mar de 2001). Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat. *Clin Infect Dis*, 32, 897-928.

Parola, P., Paddock, C., & Raoult, D. (October de 2005). Tick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. *Clin Microbiol Rev*, 18(4), 719-756.

Philip, R., Casper, E., Burgdorfer, W., Gerloff, R., Hughes, L., & Bell, E. (1978). Serologic typing of Rickettsiae of spotted fever group by microimmunofluorescence. *J Immunol*, 121(5), 1961–1968.

Procop, G., Burchette, J., Howell, D., & Sexton, D. (Aug de 1997). Immunoperoxidase and immunofluorescent staining of Rickettsia rickettsii in skin biopsies. *Arch Pathol Lab Med*, 121, 894-899.

Raoult, D., & Roux, V. (October de 1997). Rickettsioses as Paradigms of New or Emerging Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev*, 10(4), 649-719.

Ricketts, H. (1906). The study of “Rocky Mountain spotted fever” (tick fever?) by means of animal inoculations. A preliminary communication. *JAMA*, 47, 33-36.

Ricketts, H. (1909). Some Aspects of Rocky Mountain Spotted Fever as Shown by Recent Investigations. *Reviews of Infectious Diseases*(76), 843-855.

Roux, V., & Raoult, D. (2000). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *Phylogenetic analysis of members of the genus Rickettsia using the gene encoding the outer membrane protein rOmpB (ompB)*. , 50, 1449–1455.

Schoonjans, F. (16 - 18 de Octubre de 2020). *MedCalc - User-friendly statistical software*. Obtenido de <https://www.medcalc.org/index.php>

Schwartz, A. (13-18 de Octubre de 2006). *Diagnostic Test Calculator*. Obtenido de <http://araw.mede.uic.edu/cgi-bin/testcalc.pl>

Shepard, C., & Wyckoff, R. (31 de May de 1946). The Nature Of The Soluble Antigen From Typhus Rickettsiae . *Public Health Reports*, 61(22), 761-800.

Spencer, R. (April de 1929). Rocky Mountain Spotted Fever . (O. U. Press, Ed.) *The Journal of Infectious Diseases* , 44(4), 257-276.

Staquet, M., Rozenzweig, M., Lee, y., & Miggia, F. (1981). Methodology for the Assessment of New Dichotomous Diagnostic Tests. *J Chron Dis*, 599 -610.

Stiles, J. (2000.). Canine Rickettsial Infections. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.*, 30(5), 1144-1148.

Stothard, D., & Fuerst, P. (1995). Evolutionary Analysis of the Spotted Fever and Thyphus Groups of Rickettsia Using 16S rRNA Gene Sequences. *System. Appl. Microbiol.* , 18, 52-61.

Tanner, N., & Evans, T. (2014). Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of Nucleic Acids. *Curr Protoc Mol Biol*, 15.14.13.

TDR. (2010). Evaluating Diagnostics. *Nat Rev*, S27-S29.

Thorner, A., Walker, D., & Petri, W. (December de 1998). Rocky Mountain Spotted Fever. *Clin. Infect. Dis*, 27, 1353-1360.

Tinoco-Gracia, L., Rodríguez, M. H.-O., Stephenson, N., & Foley, J. (2018). Molecular Confirmation of Rocky Mountain Spotted Fever Epidemic Agent in Mexicali, Mexico. *Emerg Infect Dis*, 24(9), 1723-1725.

Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., & Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products . *Nat. Protoc.*, 3(5), 877-882.

Topping, H., & Shear, M. (29 de December de 1944). Studies of Antigens in Infected Yolk Sacs. *Public Health Reports*, 59(52), 1671-1675.

Tzianabos, T., Anderson, B., & McDade, J. (1990). Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in clinical specimens by enzymatic amplification using polymerase chain reaction technology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 590(1), 553-556.

Tzianabos, T., Palmer, E., Obijesky, J., & Martin, M. (September de 1974). Origin and Structure of the Group-Specific, Complement-Fixing Antigen of *Rickettsia rickettsii*. *Applied Microbiology*, 28(3), 481-488.

Van Stralen, K., Stel, V., Reitsma, J., Dekker, F., Zoccali, C., & Jager, K. (2009). Diagnostic methods I: sensitivity, specificity, and other measures of accuracy. *Kidney Int.*, 1257–1263.

Walker, D. (July de 1989). Rocky Mountain Spotted Fever: a Disease in Need of Microbiological Concern. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2(3), 227-240.

Walker, D. (1995). Rocky Mountain Spotted Fever: A Seasonal Alert . *Clin. Infect. Dis.*, 20, 1111-1117.

Walker, D. (2007). Rickettsiae and Rickettsial Infections: The Current State of Knowledge . *Clin. Infect. Dis.*, 45, S39–S44 .

Walker, D., Cain, B., & Olmstead, M. (1978). Laboratory Diagnosis of Rocky Mountain Spotted Fever by Immunofluorescent Demonstration of *Rickettsia rickettsii* in Cutaneous Lesions . *Am. J. Clin. Pathol.*, 69(6), 619–623.

Walker, D., & Bouyer, D. (2015). Rickettsia and Orientia. En K. Carroll, J. Jorgensen, & M. Pfaller, *Manual of Clinical Microbiology* (págs. 1122-1134). ASM Press, Washington, DC.

Walker, D., & Ismail, N. (2008). Emerging and re-emerging rickettsioses: endothelial cell infection and early disease events . *Nat. Rev. Microbiol.*, 6, 375- 386.

Walker, D., Burday, M., & Folds, J. . . (1 de Nov de 1980). Laboratory diagnosis of Rocky Mountain spotted fever. *South. Med. J.*, 73(11), 1443-1449.

Walker, D., Paddock, C., & Dumler, J. (2008). Emerging and Re-emerging Tick-Transmitted Rickettsial and Ehrlichial Infections. *Med. Clin. N. Am.*, 92, 1345–1361.

Weisburg, W., Dobson, M., Samuel, J., Dasch, G., Mallavia, L., Baca, O., . . . Woese, C. (4 de Aug de 1989). Phylogenetic Diversity of the Rickettsiae . *J. Bacteriol.*, 171(8), 4202-4206.

Wilson, L., & Chowning, W. (2 de January de 1904). Studies in Pyroplasmiasis Hominis. ("Spotted Fever" or "Tick Fever" of the Rocky Mountains.). *J. Infect. Dis.*, 1(1), 31-57.

Wolbach, B. (November de 1919). Studies on Rocky Mountain Spotted Fever. *J. Med. Res.*, 41(1), 1-197.

Woods, G., & Walker, D. (1996). Detection of Infection or Infectious Agents by Use of Cytologic and Histologic Stains. *Clin. Microbiol. Rev.*, 9(3), 382–404.

Yoder, J., Benoit, J., Rellinger, E., & Tank, J. (2006.). Developmental profiles in tick water balance with a focus on the new Rocky Mountain spotted fever vector, *Rhipicephalus sanguineus*. *Med. Vet. Entomol.*, 20, 365–372.

Zavala-Castro, J., Zavala-Velázquez, J., Walker, D., Ruiz, A., Laviada-Molina, H., Olano, J., . . . Dzul-Rosado, K. (2006). Fatal Human Infection with *Rickettsia rickettsii*, Yucatán, México. *Emerg. Infect. Dis.*, 12(4), 672-674.